

최 종
연구보고서

국내산 관목식물자원을 활용한 정유물질
생산과 이를 이용한 기능성 제품 공정 개발

(주) 오 지 텍

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 관목식물자원을 활용한 정유물질 생산과 이를 이용한 기능성 제품 공정 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 일

주관연구기관명 : (주) 오 지 텍

총괄연구책임자 : 박 영 식

선 임 연 구 원 : 최 근 표

연 구 원 : 유 재 은

이 현 수

박 진 홍

협동연구기관명 : 강 원 대 학 교

협동연구책임자 : 김 중 대

협 동 연 구 원 : 이 현 용

윤 정 식

요 약 문

I. 제 목

국내산 관목식물자원을 활용한 정유물질 생산과 이를 이용한 기능성 제품 공정개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

대부분의 정유들은 부위별로 다르지만 함량이 매우 낮아 생산성 및 추출 시 활성 감소 등으로 제품화에 많은 어려움이 있다. 하지만 초임계 추출 및 다단계 복합적 공정을 이용해 이들 정유 성분을 추출하게 되면 추출 수율이 혁신적으로 증가될 뿐만 아니라 활성 유지 혹은 synergy 효과가 가능한 기술이다. 하지만 이들 기술이 대부분 다년생 혹은 일년생 향초를 대상으로 한 것으로 관목류의 목질 또는 내 외피, 열매 부분의 경우가 기술의 적용에 대한 검토가 필요하며 이들 기능을 향상시킬 수 있는 기술 개발을 이루고자한다. 또한 기존의 다년생 혹은 일년생 향초들의 향기 성분 및 향유들의 활용은 대부분이 향기성분들의 종류 분석 및 구조 등에 치우쳐 있으며 이들의 생리활성에 관한 연구도 극히 초보적인 수준이다. 더욱이 관목자원을 이용한 향기 성분이나 정유는 극히 몇 종의 수종에만 국한되어 있을 뿐만 아니라 이들의 생리 활성 및 활용에 관한 연구는 극히 미진한 상황이다. 이에 관목 자원으로부터 새로운 유용 활성들을 가진 정유들을 이용한 새로운 기능성 식품, 생물 의약품 또는 소재화 기술 개발을 이루어 기존의 제품들과 같이 향유를 이용한 단순한 방향 관련 제품이 아닌 정유의 새로운 유용 생리활성 기능을 가진 새로운 형태의 기능성 식품 및 생물의약품 소재 개발을 이루고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내산 관목식물자원을 활용하여 고수율의 정유물질 생산과 공정개발 그리고 이를 이용한 기능성 제품 및 생물의약품 소재와 같은 새로운 제품을 개발이 주목표이다 이를 위해 3년 동안 연차별 연구내용으로 추진하였다.

1차 연도에는 관목자원의 정유 성분 추출 및 수율 증진 기술을 개발하기 위해 초임계 및 다단계 추출기술로 고수율의 정유 추출 기술 확립하였고, 다양한 수목 자원들의 부위별 (목질, 외피, 내피, 열매, 잎, 뿌리 등) 수율 증진이 가능한 추출 공정을 개발하였다. 또한 국내 수목 자원 및 정유 활성 성분들의 Data - base 화를 위한 기초를 확립하였고, 국내에 자생하며 대량 채취가 가능한 수목자원의 선별 및 배양 기초 기술을 확립하였다. 이를 바탕으로 대상 정유류 들의 제품화 적성(성능) 실험 즉 대상 수목들 내 존재하는 제품화가 가능한 정유의 생리 활성 성분 검색하고, 활성 성분들의 고농도 농축, 추출 및 가공이 용이한 공정 적성 실험을 수행하여 상기의 연구로 정유 물질의 유용성(생리활성 검증), 고수율 및 제품화 가능성을 바탕으로 2년차, 3년차의 집중적 연구 개발을 위한 관목 및 정유 물질의 결정하였다.

2차 연도에는 1차 연도에 진행한 연구결과를 바탕으로 활성이 있다고 판단되는 대상 관목자원의 정유 성분 추출 및 수율 증진 기술확립을 위해 연구를 진행하였고, 정유 생산 공정의 scale-up 및 최적화 기반을 마련하였다. 또한 다양한 수목 자원들의 수율 증진이 가능한 추출 공정 개발하였다. 또한 1차년도 관목의 정유 물질의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였으며, 노간주외 3종의 유용 활성 성분의 독성 실험, *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 보다 체계적인 연구를 통한 제품화 가능성을 검증하였다. 그리고 대상 관목의 농가 계약 재배를 위한 유기적 협조 구축을 위한 시도를 진행하였고, 국내 자생하며 대량 채취 가능한 수목자원의 선별 및 계약 재배 가능한 협조 구축하고자 노력하였다. 또한 본 연구를 통해 대상 정유류 들의 제품화 적성(성능) 실험 수행을 위하여 대상 수목들 내 존재하는 제품화가 가능한 정유의 생리 활성 성분 검색하였고, 활성 성분들의 고농도 농축, 추출 및 가공이 용이한 공정 적성 실험을 수행하였다. 따라서 상기의 연구로 정유 물질의 유용성(생리활성 검증), 고수율 및 제품화 가능성을 바탕으로 3년차의 집중적 연구 개발을 위한 관목 및 정유 물질의 결정하였고, 기술 관련 특허 및 학회 발표를 추진하였다.

마지막으로 3차 연도에는 1,2차 연도에 진행한 연구결과를 바탕으로 대상관목 중 제품화가 가능한 정유 성분은 선별, 고수율 공정을 이용해 기능성 식품을 위한 제품화 공정 확립하여 음료, 다류, 환, oil 제품 등을 생산하기 위한 각개별 단위 공정들의 연결 및

총체적 system 확립하고자 하였다. 이를 바탕으로 결정 공정에 따른 시제품 생산하고, 유용 활성이 높은 수목자원의 대량 식재 지역 선정하여 임업 농가 계약 재배 및 방법 지도를 통해 농가소득 증대에도 기여하고자 하였고, 개발 공정 및 시제품들을 marketing 분석 및 기타 경제적 타당성 연구 검토 농가의 관목 재배 기술지도 및 계약 재배를 위한 방안을 구축하고자 하였고, 최종 연구결과를 바탕으로 학회발표도 추진하였다. 또한 이 같은 실험 결과를 바탕으로 정유 추출기술의 상용화를 위한 시설 및 운영비 계산 등과 같은 경제성 분석을 통해 최종 산업화를 위한 model을 확정한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 추출기술을 이용해 기능성 식품이나 생물의약품 소재 및 제품 상용화 및 범용화를 위해 소요되는 초기 설비 비용의 일부를 정부에서 보존하는 방안이 필요할 것으로 예상되며, 생산 공정의 scale-up을 위한 제조 업체의 기술 확립 및 이전에 관한 인프라 구축에 소요되는 예산 및 인력 지원도 필요한 것으로 예상된다.

SUMMARY

There have been numerous reports on utilizing essential oils because they can be used for many purposes, such as aromatherapy, food constituents, phytopharmaceutical and phytocosmetic preparations etc. Even though relatively broad studies on the oils have been studied, antimicrobial activities and other psychological effects are mainly focused.

Extraction of essential oils from medicinal herbs is various account to the parts of plants and extract refining of most the region. It is different especially but the contents are very low. It could cause to differ the extraction activities and to develop various kinds of the products. It has been shown that the composition of the oils obtained by a conventional steam distillation oil isolation(SDE) process was quite different from that by supercritical fluid extraction(SFE) process for many kinds of plants. However, it has not been well investigated that the correlation between the differences of oil compositions and their biological efficacy by simultaneously comparing these variables, even though the extract from SFE are fairly much used in many oil industries. According to utilizing parts of plants we have produced various essential oils. It was difficult to make them into products because of the decreases of the productivities and/or extractive activities.

If we were produced some essential oils from many kinds of plants by supercritical fluid extraction(SFE) process or steam distillation oil isolation(SDE) process. Extractive yields of essential oils as well as controls of activity and synergy would be able to increase gradually. However these processes went on the examination by perennial or annual plant. It would be necessary to achieve new technical improvements about the xylem, or endoderm or exoderm, and fruits of bush. Most the preceding researches were often biased by structural or component analysis of aroma ingredients.

More over they weren't spreaded only widely about the researches of aroma ingredients or essential oils but also they had reserched very narrowly about the biological activities and utilities.

Therefore we have tried to developpe new processes and a functional food from various sources of bush for 3 years. In the end essential oils from Fennel fruit and truck of *Foeniculum vulgare* Mill, Olibanum resin, *Boswellia carteii* Birew were extracted by a supereritical fluid extraction system(SFE) and biological activities were investigated. SFE technique was applied for the isolation and purification of nonpolar biologically active essential oils from each samples. The quantitative analysis of essential oils was carried out by gas chromatograthy–mass spectrometer(GC/MS). As a result, we completed the bases of new processes and functional foods such a pouches, pills, tablets, and granules etc. We also examined economic feasibility of the proposed products and marketing analysis about essential oils.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	11
Chapter 2. Recent advances in technology in domestic and foreign countries -----	13
Chapter 3. Results of the projects -----	16
Part 1. Development of extract process and functional food from essential oil extraction and yield increase technique of bush resources -----	16
1. Experimental methods -----	16
1.1. Extract methods & Analytical methodes -----	16
2. Results and Discussion-----	19
Part 2. Manufactures of functional foods and study on economics feasibility -----	31
1. Experimental methods -----	31
1.1. Product efficiency test and manufacture of functional foods and economic analysis by bush resources -----	31
2. Results and Discussion -----	36
Part 3. Screening of Biological activity of essential oil of bush resources -----	41
1. Experimental method -----	41
1.1. Anti-cancer and cytotoxicity -----	41
1.2. Anti-mutagenicity -----	42

1.3. GST(glutathione-S-transferase) activities -----	43
1.4. Neurotrophic activities on PC 12 cell -----	43
1.5. Immunomodulating activities -----	43
1.6. Apoptosis-----	44
1.7. Effect on natural killer -----	44
1.8. Differentiation-----	44
1.9. <i>in vivo</i> anti-cancer test -----	45
2. Results and Discussion-----	46
Chapter 4. Summary-----	70
Chapter 5. Achievement of the proposed goal and contribution to relevant -----	72
Chapter 6. Plans for utilization of the results obtain from this project -----	74
Chapter 7. Science and Engineering Information obtained by the course of conducting this project -----	75
Chapter 8. References-----	79

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	관목자원의 정유 성분 추출 및 수율 증진 기술	16
1. 실험 내용		16
가. 관목 자원의 정유 추출 방법 및 성분 분석		16
2. 결과 및 고찰		19
제 2 절	관목자원 정유의 제품화 적성(성능)실험 및 기능성 제품 제조와 경제성 평가	31
1. 실험 내용		31
가. 관목자원 정유 성분을 첨가한 기능성 제품 제조 및 제품화 적성(성능)과 경제성 평가		31
2. 결과 및 고찰		36
제 3 절	관목자원 정유내 성분의 생리 활성 탐색	41
1. 실험 내용		41
가. 항암 활성 및 세포 독성 측정		41
나. 항돌연변이원성 측정		42

다. 간기능 관련 생리 활성 측정 -----	43
라. 신경세포의 생육촉진 활성 측정-----	43
마. 면역세포에 대한 생육도 평가 및 TNF- α , IL-6 분비량 측정 -----	43
바. 세포사멸 형태 측정 -----	44
사. Natural killer cell 활성도 측정 -----	44
아. HL-60 세포를 이용한 분화도 측정 -----	44
자. Mice를 이용한 in vivo 항암 실험 -----	45
2. 결과 및 고찰 -----	46
제 4 장 요약 -----	70
제 5 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 -----	72
제 6 장 연구 개발 결과의 활용 계획 -----	74
제 7 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	75
제 8 장 참고문헌 -----	79

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

대부분의 정유들은 부위별로 다르지만 함량이 매우 낮아 생산성 및 추출 시 활성 감소 등으로 제품화에 많은 어려움이 있다.

초임계 추출 및 다단계 복합적 공정을 이용해 이들 정유 성분의 추출 수율이 혁신적으로 증가될 뿐만 아니라 활성 유지 혹은 synergy 효과가 가능한 기술이다. 하지만 이들 기술이 대부분 다년생 혹은 일년생 향초를 대상으로 한 것으로 관목류의 목질 또는 내외피, 열매 부분의 경우 이 기술의 적용에 대한 검토가 필요하며 이들 기능을 향상시킬 수 있는 기술 개발을 이루고자 한다.

기존의 다년생 혹은 일년생 향초들의 향기 성분 및 향유들의 활용은 대부분이 향기 성분들의 종류 분석 및 구조 등에 치우쳐 있으며 이들의 생리활성에 관한 연구도 극히 초보적인 수준이다.

더욱이 관목자원을 이용한 향기 성분이나 정유는 극히 몇 종의 수종에만 국한되어 있을 뿐만 아니라 이들의 생리 활성 및 활용에 관한 연구는 극히 미진한 상황이다.

이에 관목 자원으로부터 새로운 유용 활성들을 가진 정유들을 이용한 새로운 기능성 식품, 생물 의약품 또는 소재화 기술 개발을 이루어 기존의 제품들과 같이 향유를 이용한 단순한 방향 관련 제품이 아닌 정유의 새로운 유용 생리활성 기능을 가진 새로운 형태의 기능성 식품 및 생물의약품 소재 개발을 이루고자 한다.

특히 기존의 향기 성분들의 활용에는 방향류, 화장품, 식품 단순 첨가제 등과 같이 기능을 강조하기 보다는 향기 제품으로서 단순한 경우가 많아 그 응용성 확대에 제약이 많다. 이에 반해 정유는 향기 성분에 비해 유용 활성이 많을 뿐 아니라 적용 범위가 매우 넓다. 하지만 이들 정유 성분들에 대한 체계적인 연구가 거의 안되어 있으며 지금까지 대부분의 활성 연구는 용매 추출물들에 대한 연구로서 정유의 활용과는 다른 측면에서 접근이 되고 있었다.

또한 기존의 기능성 식품 또는 소재들을 일단 식품으로 섭취할 경우 체내에서 여러 경로를 통해 반응이 나타나게 되므로 효과가 느리거나 적게 나타나는 경우가 많으며 생리 활성에 한계가 있는데 반해 정유는 직접 후각, 피부, 점막 세포 등을 통해 직접적으로 반응해 그 효과 빠르며 좋게 나타날 가능성이 매우 높아 활용도가 높다. 특히 일반 기능성 식품들은 신경 계통의 작용에는 매우 제한적이거나 활성이

낮으나 정유 계통은 신경 세포에 직접적으로 반응해 치매, 노화 등의 조절에 매우 효과적이다.

따라서 본 과제는 3년 동안의 중기적 연구를 수행함으로써 국내 자생 관목자원들의 정유 성분의 수율 증진, 대량 생산 공정의 확립 및 제품화를 위한 유용 정유 성분들의 유지가 가능한 대량 추출기술 확립 및 유용 정유성분들의 정제와 정유 물질에 대한 새로운 생리 활성 및 기능들에 대한 종합적이고 체계적인 연구를 진행하여 새로운 기능성 식품 및 생물 의약품 소재화 기술을 개발하고, 또한 기존의 제품들과 같이 향유를 이용한 단순한 방향 관련 제품이 아닌 정유의 새로운 유용 생리활성 기능을 가진 새로운 형태의 기능성 식품 및 생물 의약품을 개발하고자 한다.

이 같은 목적을 달성하기 위해 1차 연도에는 관목자원의 초임계 및 다단계 추출기술로 고수율의 정유 추출 기술을 확립하고, 대상 관목들 내 존재하는 제품화가 가능한 정유 생리 활성 성분을 검색, 활성 성분들의 고농도 농축, 추출 및 가공이 용이한 공정 적성(성능) 실험을 통해 차기 2차 연도 연구를 위한 관목 및 정유를 결정한다. 이를 바탕으로 차기 연도에는 유용 활성 성분의 유지가 가능한 지역 식재, 채취 방법을 확립하고, 정유 생산 공정의 scale-up 및 최적화, 대상 정유의 정제 및 유용 생리 활성 증진 방법을 개발해 대상 관목의 농가 계약 재배를 위한 유기적 협조 구축 및 유용 정유의 제품화 기초를 확립한다. 마지막 3차 연도에는 관목자원으로부터 생산된 정유를 활용한 기능성 소재 또는 식품 생산을 위한 제품화 공정을 확립하고, 유용 정유 성분들의 유지가 가능한 대량 추출기술을 최종적으로 확립하여 결정 공정에 따른 시제품 및 개발 공정들의 경제적 타당성을 연구 검토해 시제품 생산 및 제품 판매의 초석을 마련하여 정유를 이용한 기능성 식품 및 생물 의약품의 제품화와 판매 기반을 확보한다.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

향유란 향기 성분이 강한 정유 (essential oil)로서 국내에서는 현재 이 분야에 대한 연구와 상품화가 극히 초보적인 수준이다. 국내에서 유통되고 있는 향기, 향료 및 정유 제품들의 90% 는 수입산 ‘향초’들을 이용한 것으로 국내에서 개발된 제품 혹은 작목은 극히 미미한 실정이다. 더욱이 국내 자생하거나 재배 가능한 향초 및 수목 자원들에 대한 자료나 D-base화는 지극히 원시적인 수준이고, 대부분의 향기, 향료 및 정유에 관한 연구는 로즈마리, 라벤다, 쑥, 쥐오줌이풀 등 과 같이 향초와 같은 다년생 초본의 꽃, 열매, 잎 등에서 주로 추출하거나 합성되는 연구가 진행되어 왔다.

이에 반해 수목 자원을 이용한 정유 및 향기 성분에 대한 연구는 향나무나, 노간주나무 등과 같은 극히 제한적인 나무를 대상으로 이들 성분 분석 등에 관한 초보적인 연구가 이루어졌을 뿐 극히 미미한 실정이었다. 특히 우리나라와 같이 산지가 70% 이상을 차지하고 이에 따른 다양한 산림 자원 특히 수목 자원이 풍부함에도 불구하고 이런 산림 자원의 활용성 증진에 관한 연구가 극히 미진한 실정이었다.

또한 최근의 기능성 식품 및 소재에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있으나 대부분이 임산자원의 용매 추출물들의 활성을 검증하는 것으로 새로운 소재 개발의 한계에 직면하고 있었다.

이에 반해 ‘향유’에 관한 연구들은 세계적으로도 연구 진행 정도가 우리가 catch-up 할 수 있는 수준에 머물고 있으며, 이 물질들에 대한 연구는 기존의 추출물들을 이용한 기능성 소재 개발보다 한 차원 높은 발전과 성공 가능성, 새로운 물질 개발 가능성을 제시하고 있다. 이에 반해 문화 선진국인 미국 일본, 유럽 등에서는 가장 선호되는 사업이며 사업성이 높은 분야로 선정되어 집중적인 투자가 이루어지고 있다. 현재 미국의 경우 향기 산업이 국내의 경우만 약 \$50,000,000 규모이며 수출까지 포함하면 \$300,000,000 규모로서 단일 상품군으로도 꽤 높은 점유율을 차지하고 있다.

하지만 국내의 경우 이 분야는 전혀 불모지이며 일부 영세 농가를 중심으로 10 여 군데 (정선, 평창, 제주, 청양 등) 에서 약 500-1000 평 규모로 소규모 비닐 하우스 수준에서 연 1억~2억 정도의 매출 수준을 유지하는 영세한 사업을 영위하고 있으며, 강원 정선, 충북 청주의 경우 지자체에서 시험적 수준으로 진행되고 있는 수준이다. 이것들도 대부분이 향초를 중심으로 하고 있으며 수목자원을 이용한 향유에 대한 기술 개발 사업은 거의 전무한 실정이었다.

지금까지는 다양한 마스크를 통해 한약 및 건강식품에 대한 부정적, 긍정적 사례들이 나타나고 있어 일반 소비자들이 자연 및 건강 식품에 대한 중요성, 필요성 및 이해도는 높아졌으나, 너무나 많은 곳에서 나와 이들에 대한 혼동과 냉소적 경향이 강해지고 있는 실정이다.

더군다나 IMF 이후 계속되는 경제적 위기와 맞물려 이들에 대한 소비가 급속히 위축되어 이들 원재료를 이용한 새로운 제품 개발 및 판매 전략이 필요한 시점이라 사료되었다. 이에 향초를 이용한 제품들은 다른 농산물 제품들과 달리 단순한 가공 공정을 거치면서도 부가 가치가 높은 제품이며 소비 대상도 안정적 심리를 구축한 중, 상류 계층으로 지속적 소지가 가능하리라 판단되었다.

또한 현재 국내 향초 시장은 전혀 형성이 안되어 예측하기 어려우나 건강식품이 약 1조원, 화장품이 약 2.5조원, 일반 가공 농산물 제품(엑기스, 다류 등)이 약 2-3조원인 것을 감안하면 향초 시장은 향후 5년 안에 5,000억 ~ 1조원 대에 진입이 가능할 것으로 예측된다.

정유 제품들은 문화 제품으로 국민 수준이 향상될수록 자연 향을 선호하며 향기를 이용한 질병 치료에 대한 호기심과 기호도가 계속 증진하는 현상에서 이 같은 가공 제품 개발은 농가의 소득 증대 및 새로운 소득 작목 개발 등에서 그 의의가 클 것으로 예상된다.

하지만 기존의 정유 제품들은 대부분이 향기 성분들의 활용에 그치고 있으며, 이들 향기 성분들은 대부분이 휘발성이며 열에 약하고 기체 형태로 되어 있어 가공 상 제약이 많아 다양한 형태의 제품군의 개발에 큰 제약이 되고 있다.

이에 본 연구는 국내 70%를 차지하는 산림 자원 중 활용 가능성이 높은 수목 자원을 이용하여 지금까지 연구가 미진한 향유를 활용하는 기술을 개발함으로써, 국내 수목자원을 이용하여 보다 다양한 형태의 제품 개발이 용이하며 단순한 향을 이용하는 경우보다 기능성을 더 상승시킬 수 있는 장점이 있다.

또한 최근 기능성 식품의 최대 관건이 치료보다는 예방적 측면에서 지금까지의 기능성 식품들이 해결하지 못하고 있는 신경 계통의 조절에 효율적 접근이 가능한 장점을 갖고 있다.

지금까지의 국내외 연구개발 실적을 살펴보면 단순히 수입산 향초들을 추출해 향신

료 등의 원재료로 사용하고 있고, 더욱이 수목류를 이용한 방향 제품은 2-3 품목으로 극히 제한적이다. 또한 단순 추출, 농축만을 통해 가공한 제품 및 소재들로서, 대부분이 향기 관련 제품들로서 구성되어 있다. 하지만 향기보다 유용성이 높은 정유 성분들을 이용한 2,3 차 가공 제품은 전무한 실정이다. 또한 정유 성분들을 분리, 정제 없이 그대로 사용해 이들에 대한 기능성 식품 소재로의 생리 활성 및 활용에 관한 공정 개발이 전혀 안 되어 있는 상태였다. 단지 향초 및 다양한 농.임산 자원을 이용한 기능성 및 활성 성분에 대한 공정학적인 기초적인 연구가 추진되고 있는 실정이었다.

때문에 이 기술이 연구, 개발되어 상용화되면 국내의 특용 작물 및 기타 임산물들의 가공 기술에 일대 변혁이 예상되며, 수목자원이 새로운 소득 작목으로 부상해 지금까지의 단순 가공을 넘어 진정한 의미의 기능성 식품 또는 식품 소재의 개발에 시초가 될 것이다. 본 연구의 성공은 기존의 임산물을 이용한 기능성 식품 개발로부터 얻을 수 있는 경제적 파급효과의 수십 배에 달하는 결과를 얻을 수 있을 것이고, 특히 이 같은 제품 및 기술 개발은 다른 식품 공정 개발들에 비해 그 성공 가능성이 매우 높으며, 공정 개발이 곧 산업화와 직결되는 장점을 갖고 있을 뿐만 아니라 본 연구 결과로 생산되는 시제품이 지금 소비자들이 요구하는 새로운 형태의 기능성 제품 수요에 절대적으로 부응하는 것으로 성공 기대치가 매우 높을 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

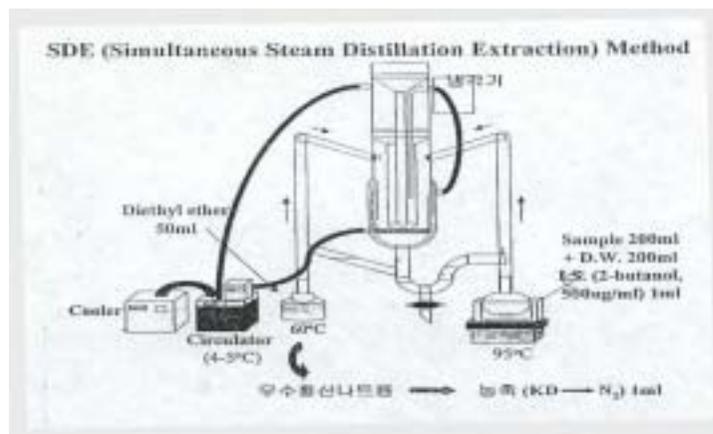
제 1 절 관목자원의 정유 성분 추출 및 수율 증진 기술

1. 실험내용

가. 관목 자원의 정유 추출 방법

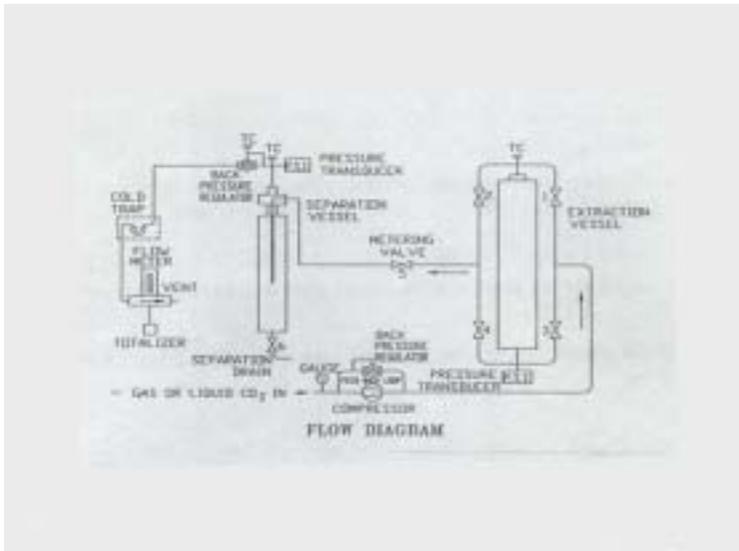
1) 연속증류추출방법(simultaneous distillation extraction method, SDE)

연속증류추출방법(simultaneous distillation extraction method, SDE)에 의하여 추출하였다. Sample-flask에는 sample 200g 과 증류수 200ml를 넣고, solvent-flask에는 diethyl ether 100 ml를 넣은 후, 약 4~5시간 가열하여 휘발성 정유와 증류수가 기화되어 나오는 것을 냉각시켜 수기에 받는다. 수기에 받아진 추출물은 수층과 ether층을 separated funnel에 넣고 약 1시간동안 방치 후, ether층만을 분리한다. 분리된 ether층은 일정량의 sodium sulfate, anhydrous(Na_2SO_4)를 넣어 24시간 탈수한다. 탈수시킨 순수한 ether층은 여과하여 rotary vacuum evaporator(35°C)로 ether가 남지 않게 농축시켜 정유성분 만을 얻는다. 정유성분의 분석은 gas-chromatography를 사용하여 100mg/10ml의 농도에서 분석하였다. SDE방법의 모식도는 다음과 같다.



2) Gas Co-distillation Solvent Extraction의 방법

Gas Co-distillation Solvent Extraction의 방법을 사용하여 추출하였다. 깨끗한 시료 20-50g 정도를 세절하여 증류수 160mL(시료를 충분히 적실 수 있는 양)를 가하고, 시료의 공기 산화를 방지하기 위해 질소 가스를 서서히 약하게 15-20분간 주입하여 flask 용기 내에 가득 채워 산소를 추출한 다음 서서히 가열한다. 그리고 질소 가스의 유속은 35mL/min으로 하여 증류액이 나오기 시작한 후 20-30분간 증류를 계속하여 15-30mL의 증류액을 받고, 이 실험을 2회 반복하여 모은 증류액을 separated funnel(분획 깔때기)에 넣고 NaCl을 포화시킨다. 여기에 CH_2Cl_2 를 증류액의 2배량을 넣어 3회 추출한다. 이 추출액에 무수황산나트륨을 적당량 첨가하여 수분을 제거하고 여과지로 여과한다. 이 추출액을 상온(약 30°C)에서 $100\text{-}300\mu\text{l}$ 까지 진공농축하여 Gas Chromatography에서 분석한다. Gas Co-distillation Solvent Extraction방법의 모식도는 다음과 같다.



3) 초임계 추출법 (초임계추출장치 - Supercritical fluid extraction system)

실험실 규모에서 생산설비에 까지 고체원료로부터 특정 성분을 추출하는 가장 일반적인 공정으로, 저장용기(R)에서 액체이산화탄소를 고압펌프(P)로 추출 압력까지 압축하고, 열교환기(H1)를 거쳐 추출온도로 유지한다. 추출용기(E)에서 특정한 물질을 추출하게 된다.

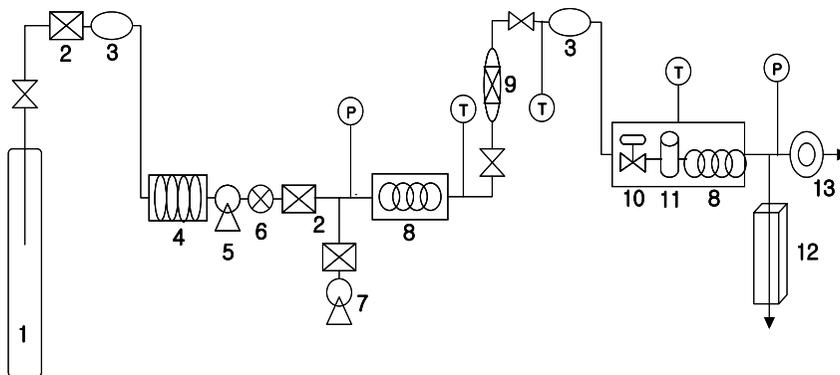
- 초임계 추출조건

압력, 온도(psi, °C)	3000~3500 psi, 35~45°C
가압시간(hour)	3hour
추출온도(°C)	60°C

- 시료 처리방법 : 본 실험에 사용된 시료들은 세절기를 이용하여 미세하게 절단한 후 시료100 g을 거즈로 처리한 뒤 vessel부에 넣어 실험을 실시하였다.



Fig. 1. Supercritical Fluid extraction system.



- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1. CO ₂ cylinder | 2. Check valve | 3. Filter |
| 4. Cooling bath | 5. High pressure pump | 6. Safety valve |
| 7. Cosolvent pump | 8. Preheater | 9. Extractor |
| 10. Metering valve | 11. Back pressure regulator | 12. Separator |
| 13. Gas meter | P. Pressue gauge | T. Temperature indicator |

Fig. 2. Schematic diagram of supercritical fluid extraction(SFE) apparatus.

2. 결과 및 고찰

가. 관목 자원의 정유 추출 방법 및 성분분석 I

대상 관목의 정유 성분 추출 수율은 추출 방법에 따라 차이를 보였다. 연속증류추출방법 (simultaneous distillation extraction method, SDE)에서는 딱총나무가 3.6으로 가장 높은 추출 수율을 보였고 유향, 참빛나무, 회향 순서로 추출 수율이 높았다. 또한 Gas Co-distillation Solvent Extraction의 방법을 사용하여 추출하였을 때에는 회향과 참빛나무의 추출 수율이 높았으며 유향과 노간주나무에서도 높은 추출 수율을 보였다. 따라서 현재 결과로 회향, 노간주, 참빛나무는 초임계 추출 방법으로, 딱총나무, 유향 그리고 녹나무는 SDE 추출 방법으로 추출함이 보다 높은 수율은 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

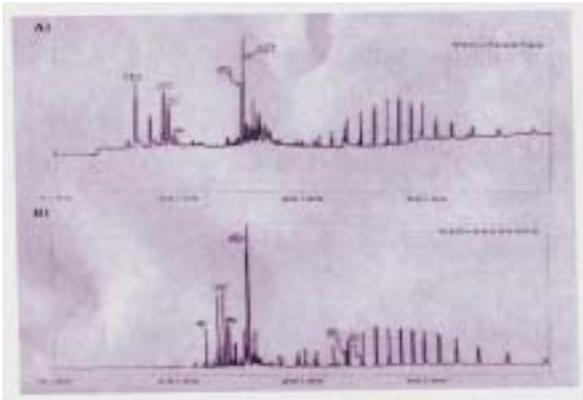
Table 1 . 추출 방법에 따른 관목 자원의 정유 추출 수율 비교

No	관 목 명	추 출 수 율(W/W %)						비 고
		SDE			초임계			
		잎(열매)	줄기	뿌리	잎(열매)	줄기	뿌리	
1	노간주	1.8	3.2	2.9	2.8	3.0	3.0	○
2	회향	2.4	1.8	5.4	3.6	1.6	3.2	○
3	유향	3.1	1.0	3.1	3.0	2.4	2.9	○
4	딱총나무	2.9	3.6	2.8	3.1	1.3	3.6	
5	참빛살나무	1.1	2.5	1.9	1.0	1.8	2.8	
6	참빛나무	1.4	2.9	2.8	1.4	3.4	1.9	○
7	녹나무	1.7	1.9	1.6	1.0	2.1	2.0	
8	백담목	3.4	3.1	3.1	2.6	2.9	3.3	
9	장미	1.4	2.9	4.5	2.9	3.0	3.2	

1) 국내산 관목 자원의 유용 정유 성분 분석 결과

가) 노간주나무 (CUPRESSACEAE측백나무과, Juniperus속, rigida종) 유용 정유성분

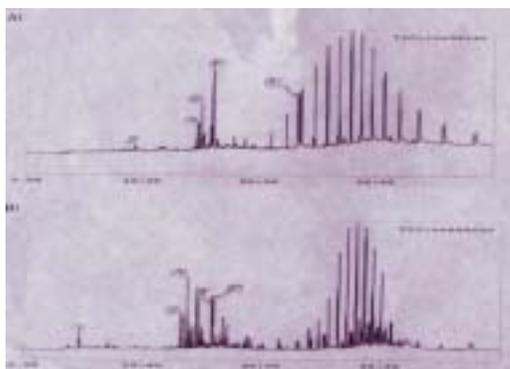
NO.	Component	
	A) SDE-줄기	B) 초임계 줄기
1*	Eucalyptolcitronellol	Terpinyl acetate
2		α -Caryophyllene
3	Borneol	Ylangene
4	Myrtenol	trans-anethol (camphor)
5	Spathulenol	Hexadecanoic acid
6	Caryophyllene oxid	-



초임계 추출 장치로 노간주 나무의 정유 물질을 각각 Gaschromatogram와 GC-Mass analysis 것으로 3peak와 3종의 유용 정유 성분이 검출 되었다. 상기의 유용 성분은 강원대학교 에서 향암 및 세포 독성 측정, 면역 증진 측정 및 간기능 관련 생리 활성 측정에 사용하였다.

나) 회향나무(APIACEAE산형과, Foeniculum속, Vulgare종)

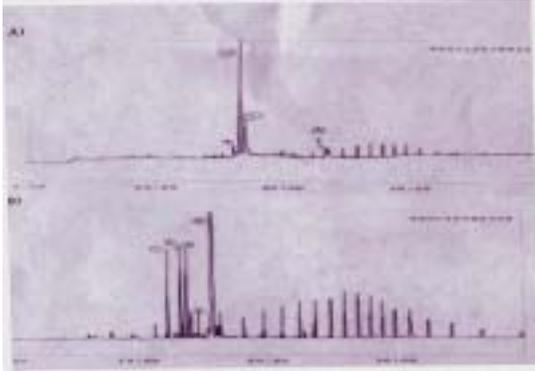
NO.	Component	
	A) SDE-뿌리	B) 초임계 잎(열매)
1*	Camphene hydrate	
2	Elemol	β -Bourbonene
3	Spathulenol	1H-Cyclopenta-pentalen-7-ol
4	α -pienens	Spathulenol
5	Hexadecanoic acid	α -mycerene



회향 나무를 초임계 추출한 정유 물질로 Gas chromatogram으로 분석한 결과 5개의 peak를 보였다. 이에 높은 peak을 모아서 생리 활성 탐색을 하였다. 또한 GC-Mass 분석으로 각 peak의 정유 성분을 분석하였다.

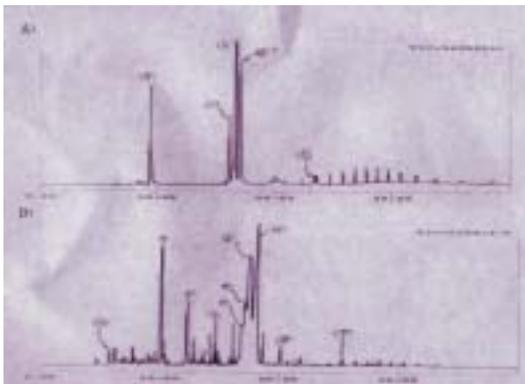
다) 유향나무

NO.	Component	
	A) SDE 잎(열매)	B) 초임계 잎(열매)
1*	1*	boswellic acid
2	2	Dictyopterene A
3	3	1,2-Butanediol
4	4	Hexadecanoic acid
5	5	olibanoresene



라) 참빛나무(CELASTRACEAE노박덩굴과, Euonymus속, alatus종)

NO.	Component	
	뿌 리	줄 기
0*	4-Terpineol	α -Phellandrene
1	citronellol	quercetin
2	6-Butyl-1,4-cycloheptadiene	Ethanone
3	mannitol	carvarol
4	Hexanedioic acid	mannitol
5		
6		Cyclopropane
7		alata mine
8		Hexadecanoic acid



정유 물질의 분석 및 유용 정유 성분의 분석한 자료로써 SDE 추출 방법을 이용한 것이다. 이는 초임계 추출 방법으로 추출보다 높은 수율을 보였다. 또한 8peak를 수집하여 협동 연구 기관인 강원대학교에 상품화 기초 연구를 위한 생리 활성 탐색을 의뢰하였다.

나. 관목 자원의 정유 추출 방법 및 성분분석 II

1) 4종의 수목의 초임계 추출물의 수율

연구개발 2차년도에는 각 천연물의 초임계 추출법을 통한 정유성분의 추출수율을 Table 2.에 나타내었다. 기존에 사용된 SDE(Simultaneous steam distillation & extraction)를 통해 추출한 정유성분의 수율도 첨가하여 비교한 결과, 기존 SDE방법에 비해 초임계 추출방법을 통하여 정유 성분을 추출시 회향의 경우 4.0%(v/w)로서 같은 SDE 추출법을 통해 분리된 2.4%(v/w)보다 초임계 추출법을 통한 분리방법이 더 높은 수율을 나타내었으며, 반면 노간주나무와 화살나무의 경우 SDE 추출법을 통한 수율이 각각 3.2, 2.9%(v/w)로 초임계 정유 추출법의 2.4, 1.9%(v/w)로 보다 높게 나타난 것을 확인하였는데, 이는 기존의 SDE 추출법의 경우 용매를 사용하여 증류하는 방식이기 때문에 시료에 사용된 용매에 용해되는 성분이 대량으로 존재할 경우, 용매를 사용하지 않는 초임계 추출법보다 높은 추출 수율을 얻을 수 있을 것이라 사료되며, 노간주나무의 경우는 목질부이며, 반면 유향이나 회향은 과실부이므로 추출용매가 사용된 SDE 추출법이 초임계 CO₂를 이용한 추출법보다 높은 수율을 얻을 수 있었으리라 사료된다.

Table 2. The extraction yield of four samples extractions by Supercritical Fluid Extraction(SFE).

Samples	Yield(%, v/w)	
	SFE	Conventional SDE
회향(열매)	4.0	2.4
유향(열매)	3.5	3.1
노간주나무(줄기)	2.4	3.2
화살나무(줄기)	1.9	2.9

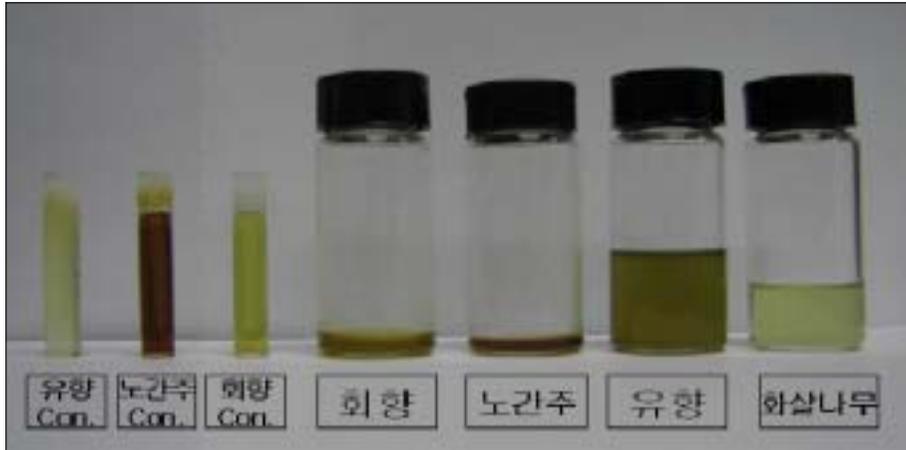


Fig. 3. Pictures of oils from *F. Vulgare*, *J. Rigida*, *B. Carteii* and *E. Alatus* by SFE processes. *Con.* means *concentrates*.

Fig. 3. 은 4가지 수목의 초임계 추출물의 사진이다. 노간주나무의 정유 추출물이 가장 진한 갈색을 나타내었으며, 회향은 그보다 연한 갈색을 나타냈다. 유향 추출물은 노간주 추출물보다 약간 탁한 색을 나타내었다. 화살나무의 추출물은 3가지 추출물에 비해 연한색을 나타내었다. 특히 회향추출물은 후각적으로 상쾌하며 마음을 편안하게 해주는 향기를 냈고, 유향 또한 독특한 향기로 달콤한 냄새를 내었다. 목질부인 노간주나무와 화살나무의 경우 마른 나무 향기가 났으며, 그리 강하지는 않지만, 상쾌한 기분을 내게 하는 독특한 향기를 가지고 있었다.

이것들의 가공을 위해 실시한 관능평가를 위해 평가인원 20명들에게 각각의 정유 추출물을 관능평가한 결과, 대체적으로 너무 강한 향으로 인해 응답자 대부분이 약간의 거부감을 나타내었다. 회향의 상큼한 오렌지향과 오이비누향이 난다고 응답하였으며, 유향은 강한 단내가 난다고 응답하였다. 노간주 나무의 경우에는 자극적인 나무향과 소나무향이 난다고 응답하였고, 화살나무의 경우 약쑥향, 한약재 향이 난다고 응답하였다.

Table 3. Results of panel test for four different oils.

Evaluation		Overall acceptance (0-10 scale)
회 향	상큼한 오렌지향, 오이 비누향, 약간의 거부감	7.2
유 향	강한 단내, 약간의 산패취	4.5
노간주나무	자극적인 나무향, 소나무 향, 약간의 거부감	8.0
화살나무	약쑥향, 한약재 향, 약간의 거부감	6.5

2) 추출된 정유성분 분석

앞은 결과와 함께 정유성분의 제품화를 위해 oil들의 조성을 검토한 결과 아래 Fig. 4, Table 4과 같이 SFE 추출의 경우 9개의 물질과 2개의 이성체가 존재하는 것으로 확인되었다. 그리고 SDE 추출에서는 5가지의 유용 물질이 분리되었다. 본 연구에서는 노간주 나무의 초임계 추출물을 이용해 항암, 유전 독성, 간기능 회복 그리고 신경세포의 활성화에 대한 실험을 수행하였다.

가) 노간주나무(*Juniperus Rigida*)의 초임계 추출물(목질부)

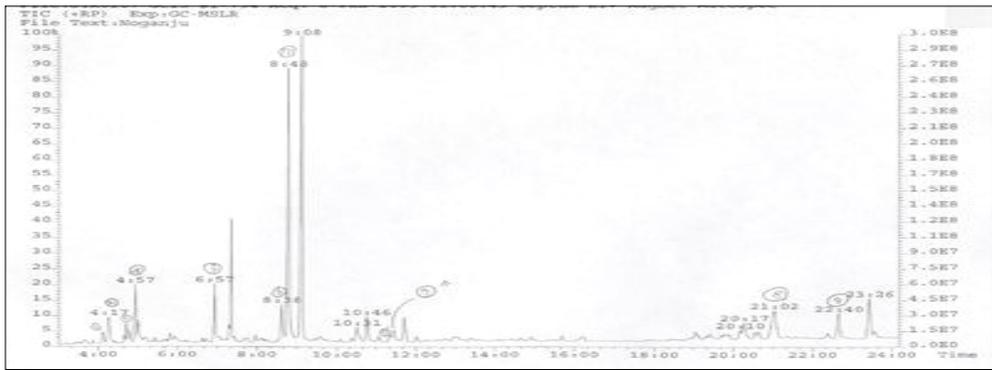


Fig. 4. Gas chromatogram of volatile constituents of *Juniperus Rigida* by SFE system.

Table 4. Comparison of volatile constituents in SFE system and SDE system.

Components	
SFE	SDE
1 Torreyol	Eucalyptolcitronellol
2 Naphthalene	Borneol
3 Longipinene	Myrtenol
4 1H-3a, 7-Methanoazulene	Spathulenol
5 Cyclohexane	Caryophyllene oxid
6 1, 5, 9-Cyclotetradecatriene	-
7 Cyclopentanol	-
' D-6-Dehydroferruginolacetate	-
'' Ferruginol	-
8 2-Methoxy [9] metacyclophane	-
9 Norolean-12-ene	-

Fig. 5. 와 Table 5.는 회향나무 열매의 초임계 추출물에 대한 GC-MS 측정 결과로서 SFE 추출의 경우 12개의 물질이 존재하는 것으로 확인되었다. 그리고 SDE 추출에서는 5가지의 유용 물질이 분리되었다. 본 연구에서는 회향의 초임계 추출물을 이용해 항암, 유전 독성, 간기능 회복 그리고 신경세포의 활성화에 대한 실험을 수행하였다.

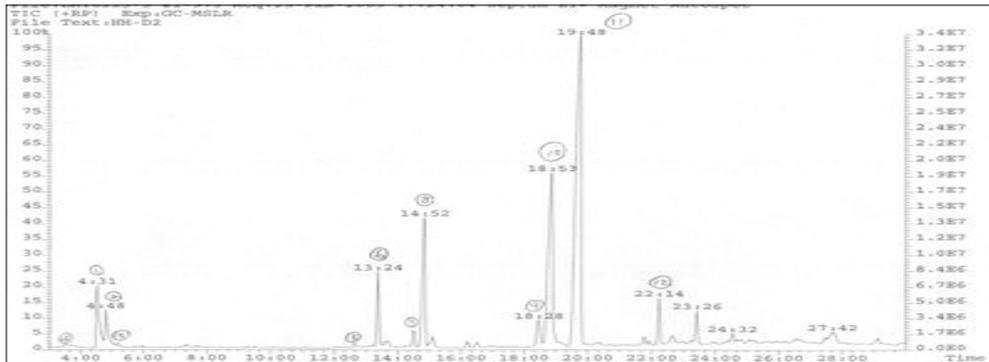


Fig. 5. Gas chromatogram of volatile constituents of *Foeniculum Vulgare* by SFE system.

Table 5. Comparison of volatile constituents in SFE system and SDE system.

Components	
SFE	SDE
1 n-Octyl acetate	Camphene hydrate
2 2-Cyclohexen-1-one	Elemol
3 Isobornyl acetate	Spathulenol
4 1-Octanol	α -pienens
5 1-Naphthalenepropanol	Hexadecanoic acid
6 1, 5, 9-Cyclotetradecatriene	-
7 Cembrene-C, Cyclohexene	-
8 Verticicol, Verticellol	-
9 1, 5, 9-Cyclotetradecatriene	-
10 trans Sabinene hydrate	-
11	-
12 Duvatriendiol	-

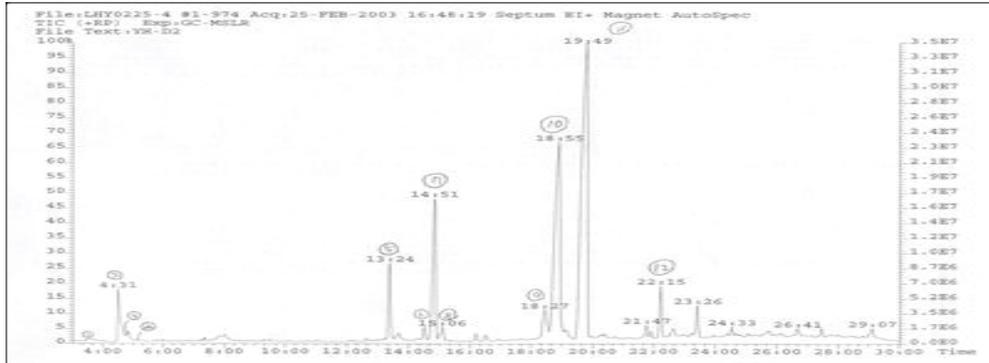


Fig. 6. Gas chromatogram of volatile constituents of *Boswellia Carterii* by SFE system.

Table 6. Comparison of volatile constituents in SFE system and SDE system.

Components	
SFE	SDE
1 1-Octyl acetate	Boswellic acid
2 n-Octyl acetate	Dictyopterene A
3 2-Cyclohexen-1-one	1,2-Butanediol
4 1-Bornyl acetate	Hexadecanoic acid
5 1, 5, 9-Cyclotetradecatriene	Olibanoresene
6 Cembrene-C	-
7 Verticilol	-
8 7번과 동일	-
9 5번과 동일	-
10 trans Sabinene hydrate	-
11 ?	-
12 Duvatriendiol	-

Fig. 6. 과 Table 6.은 유향나무 열매부의 초임계 추출물에 대한 GC-MS 측정 결과로서 SFE 추출의 경우 12개의 물질이 존재하는 것으로 확인되었다. 그리고 SDE 추출에서는 5가지의 유용 물질이 분리되었다. 본 연구에서는 유향의 초임계 추출물을 이용해 항암, 유전 독성, 간기능 회복 그리고 신경세포의 활성화에 대한 실험을 수행하였다.

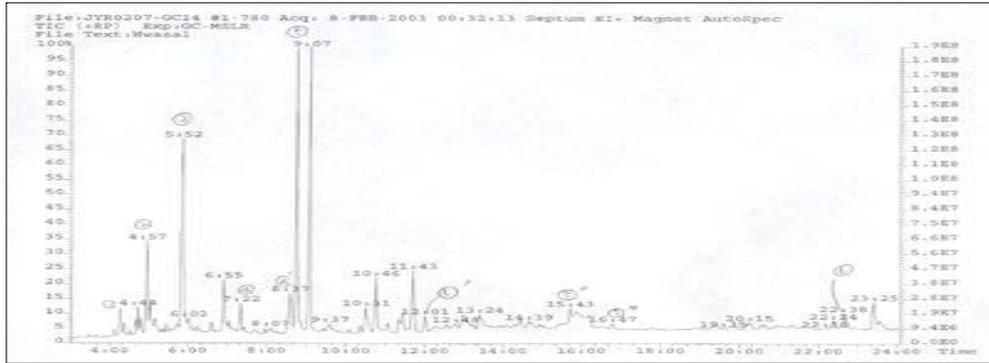


Fig. 7. Gas chromatogram of volatile constituents of *Euonymus Alatus* by SFE system.

Table 7. Comparison of volatile constituents in SFE system and SDE system.

Components	
SFE	SDE
1 Torreyol	4-Terpineol
2 Acoradinene	citronellol
3 Benzenesulfonamide	6-Butyl-1,4-cycloheptadiene
4 (+)-verticillol	mannitol
5 Cyclohexane	Hexanedioic acid
6 Cyclopentanol	-
7 Nerolidol-Epoxyacetate	-
8 1, 2-Benzenedicarboxylic acid	-
9 9(1H)-Phenanthrenone	-
10 Norolean-12-ene	-

Fig. 7. 과 Table 7.은 화살나무 목질부의 초임계 추출물에 대한 GC-MS 측정 결과로서 SFE 추출의 경우 10개의 유용 물질이 존재하는 것으로 확인되었다. 그리고 SDE 추출에서는 5가지의 유용 물질이 분리되었다. 따라서 2차년도 연구에서는 화살나무의 초임계 추출물을 이용해 향암, 유전 독성, 간기능 회복 그리고 신경세포의 활성화에 대한 실험을 수행하였다.

이와 같이 2차년도 연구를 통해 두 가지 추출방법에 따라 정유 성분의 조성이 현저히 차이나 이에 따른 향과 색의 현저한 차이가 확인되었다. 이와 함께 추출수율을 고려하면 본 연구에서 제안된 SFE 공정이 더 효과적인 것으로 평가되었다.

다. 관목 자원의 정유 추출 방법 및 성분분석 III

1) 각 시료의 추출 수율 및 초임계 추출물 사진

3차년도 연구에서는 대상 작목(3종)의 초임계 추출법을 통한 정유성분과 SDE 추출법의 수율을 비교한 결과를 table 8.에 나타내었다.

Table. 8. The extraction yield of each samples extractions by Supercritical Fluid Extraction(SFE) and Simultaneous Distillation Extraction(SDE).

Samples	SFE(% v/w)	SDE(% v/w)
<i>J. rigida</i> fruit	2.7	3.4
<i>J. rigida</i> trunk	2.4	3.2
<i>B. cartei</i> fruit	3.5	3.1

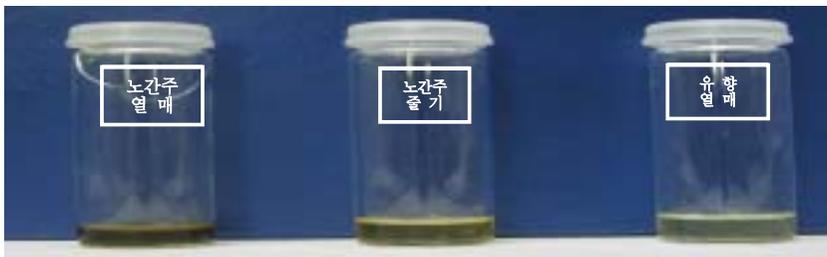


Fig. 8. 각 시료로부터 추출한 추출물 사진

2) Masking 효과 및 성분분석

인진쑥의 major peak는 1,8-Cineole, 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, Eucalyptol(4번), Camphor, Bicyclo[2.2.1]heptane-2-one, L-Camphor(7번), 5-Caranol, trans,trans-(+)-(9번), Vulgarone B(18번)이며, 인진쑥에 유향을 첨가 하였을 시 1,8-Cineole, 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, Eucalyptol(4번), Camphor, Bicyclo[2.2.1]heptane-2-one, L-Camphor(7번), Vulgarone B(18)번의 물질만이 검출되므로, 유향첨가 시 인진쑥 향기 성분 중 5-Caranol(9번)성분이 억제되어 인진쑥만의 강한향이 줄어든 것으로 사료되며, 또한 기존의 유향의 단일 major peak와 비교한 결과 주 major peak가 대부분 소실되었고 또한 인진쑥의 강한 향과 결합하여 상쇄되거나 1-Borneol(6번)과 같은 새로운 향을 생성하여 통합취를 개선한 것으로 사료되어지는 바이다.

Table. 9. Comparison of constitute of essential oils from each samples.

	<i>Artemisia princeps</i>	<i>Artemisia princeps</i> + <i>Boswellia Carteii</i>	<i>Boswellia Carteii</i>
	Components	Components	Components
1)	Camphene, Bicyclo[2.2.1]heptane	Bicyclo[3.1.0]hexane, 6-isopropylidene-1-methyl-	1-Octyl acetate
2)	1-Octen-3-OL	1,8-Cineole, 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, Eucalyptol	n-Octyl acetate, Acetic acid, Octyl ester, Caprylacetate
3)	Yomogi alcohol, 2,5,5-trimethyl-3 , 6-heptadien-2-OL	Artemisia Ketone, 3,3,6-trimethyl-1,5-heptadien- 4-one	2-Cyclohexen-1-one, 2-methy-5-(1-methylethenyl)-, (S)- d-Carvone
4)	1,8-Cineole , 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, Eucalyptol	N-Octanol, 1-Octanol, Octilin	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, 1, 7, 7-trimethyl-, acetate, (1S-endo)- 1-Bornyl acetate
5)	Artemisia Ketone	Camphor ,Bicyclo[2.2.1]heptane- 2-one, L-Camphor	1, 5, 9-Cyclotetradecatriene, 1, 5, 9,-trimethyl-12- (1-methylethenyl)- Neocembren A
6)	β -Thujone, Lyratol	1-Borneol, Bicyclo[2.2.1]heptane-2-ol	Cembrene-C, Cyclohexene
7)	Camphor , Bicyclo[2.2.1]heptane-2-one L-Camphor	Bicyclo[3.1.1]heptane-3- one, 2,6,6-trimethyl-	Verticilol
8)	Bicyclo[3.3.1]heptane-3-one Pinocarvone	n-Octyl acetate, Octyl ester, Caprylrylacetate	7번과 동일
9)	5-Caranol, trans,trans-(+)-	Vulgarone B	5번과 동일
10)	myrtenol, Bicyclo[3.1.1]hept-2- ene-2-methanol		Nerolidol-Epoxyacetate, trans Sabinene hydrate
11)	trans-Piperitol , 2-Cyclohexen-1-ol		Duvatriendiol, 19-DI-Torulosol
12)	Phenol , 2-methyl-4-(2-propenyl)- 1-(2-Propenyl)-4-Hydroxy- 3-Methoxy benzene		
13)	Benzene, Methyl eugenol, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)		
14)	trans-Caryophyllene		
15)	Butylated Hydroxytoluene, Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-m ethyl-		
16)	Spathulenol		
17)	Vulgarone A		
18)	Vulgarone B		

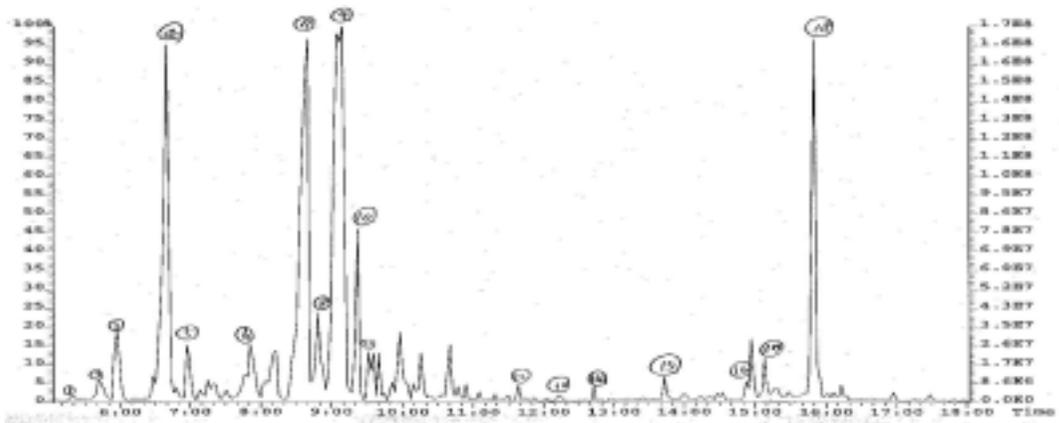


Fig. 9. Total ion chromatogram of essential oil from *Artemisia capillaris*.

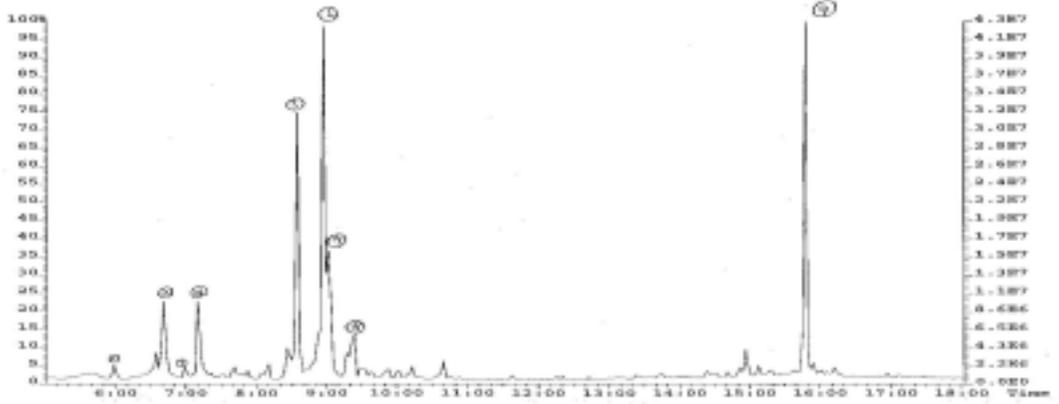


Fig. 10. Total ion chromatogram of essential oil from *Artemisia princeps* and *Boswellia Cartei*.

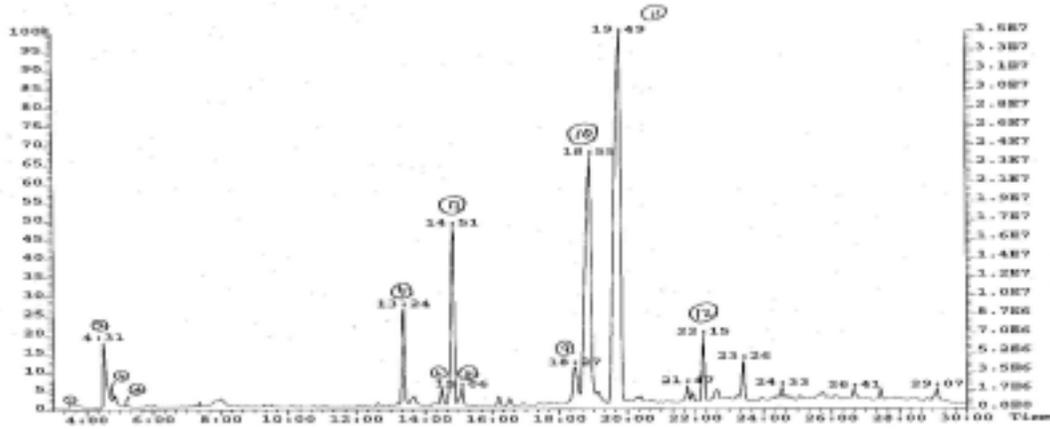


Fig. 11. Total ion chromatogram of essential oil from *Boswellia Cartei*.

제 2 절 관목자원 정유의 제품화 적성(성능)실험 및 기능성 제품 제조 와 경제성 평가

1. 실험내용

가. 초임계 추출한 각 정유 성분을 이용한 기능성 제품 제조

1) 대상 정유를 이용한 환 제조

정유 성분의 기능성을 증가시키기 위해 기존 제품에 정유를 첨가하여 환을 제조하였다. 5 : 5(w/w)의 비율로 인진쑥 가루와 찹쌀가루를 교반한 뒤 약 0.5%의 정유 성분을 첨가한 뒤 환을 제작하였다. 이번 환 제조에 사용된 인진쑥은 수율문제로 인해 농축액을 분말화 한 것을 사용하지 않고 인진쑥을 잘 세정하여 열풍건조기에서 48시간 건조시킨 것을 분쇄기로 분쇄하여 인진쑥 가루를 얻었다. 앞의 혼합비율로 인진쑥 가루와 찹쌀가루를 적당량의 물을 첨가한 뒤, 반죽기를 사용하여 반죽한 뒤 장환기를 이용하여 동일한 규격의 긴 환을 제조하였다. 이렇게 만들어진 환은 다시 제환기를 이용하여 구슬모양의 동일한 환을 제조하였다. 이후 얻어진 환은 정환기로 옮겨지고 보다 둥근모양의 환으로 만들었다. 건조과정에서 환의 윤택을 돕기 위해 10%의 꿀을 녹여 만든 수용액을 뿌려 환의 윤택과 강도를 높여 준다. 완성된 환은 공기와의 접촉을 피하기 위해 진공 포장하여 냉장이나 냉동보관 하였다.

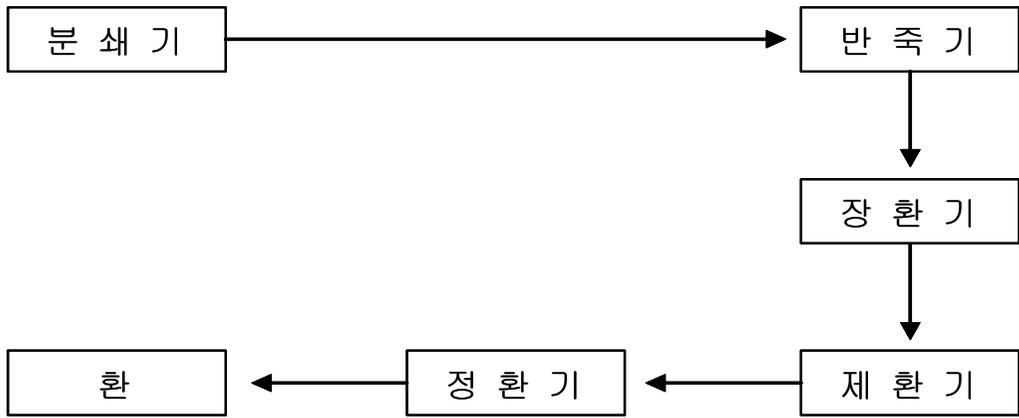


Fig. 12. 정유 성분을 이용한 환의 제조과정



(가)



(나)



(다)



(라)

Fig. 13. 정유 성분을 이용한 환 제조에 사용된 기기의 모습

(가) 분쇄기 (나) 장환기 (다) 제한기 (라) 정환기

2) 대상 정유를 이용한 과립 제조

초임계 추출한 각 정유 성분을 이용해 과립을 제조하였다. 먼저 5 : 4 : 1(w/v/v)의 비율로 무수결정 포도당 : 물 : 에탄올에 희석된 1%의 정유 성분을 잘 반죽하여 과립기를 사용하여 과립을 제조하였다. 여기에 색도를 증가시키기 위해 0.5% 이내의 카라멜이나 식용색소를 이용하여 색도를 조정하였다. 제작된 환은 넓게 펴서 음건한 뒤 향을 보존하기 위해 진공 포장하여 냉장이나 냉동보관 하였다.

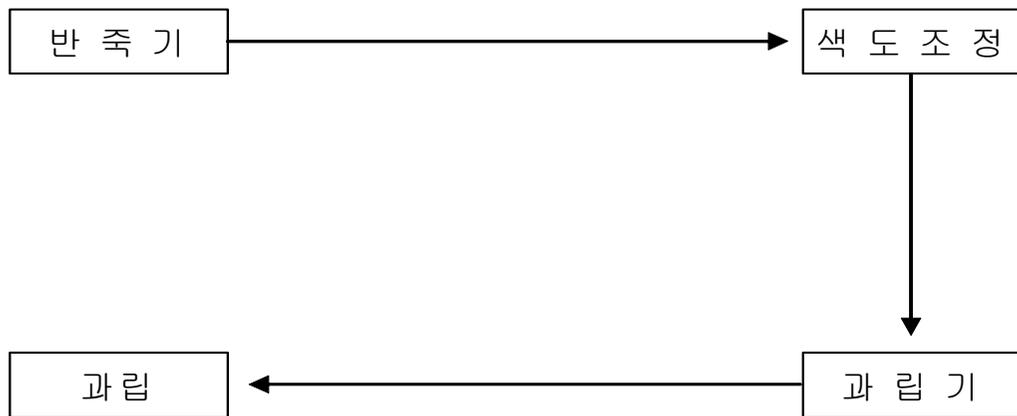


Fig. 14. 정유 성분을 이용한 과립의 제조과정



Fig. 15. 정유 성분을 이용한 과립 제조에 사용된 과립기의 모습

3) 대상 정유를 이용한 정 제조

각 정유 성분을 이용해 제작된 과립을 이용하여 정을 제조하였다. 타정 시정의 형체 유지 및 안정화를 위해 과립이외에 점증제(calcium carboxymethyl cellulose, CMC, 0.2%이하)와 결합제(sodium phosphate, monobasic)를 첨가하였다. 모든 첨가물을 첨가한 뒤 잘 교반한 후 타정기를 이용하여 정을 제조하였다. 이후 윤기와 균기를 확인하였다.

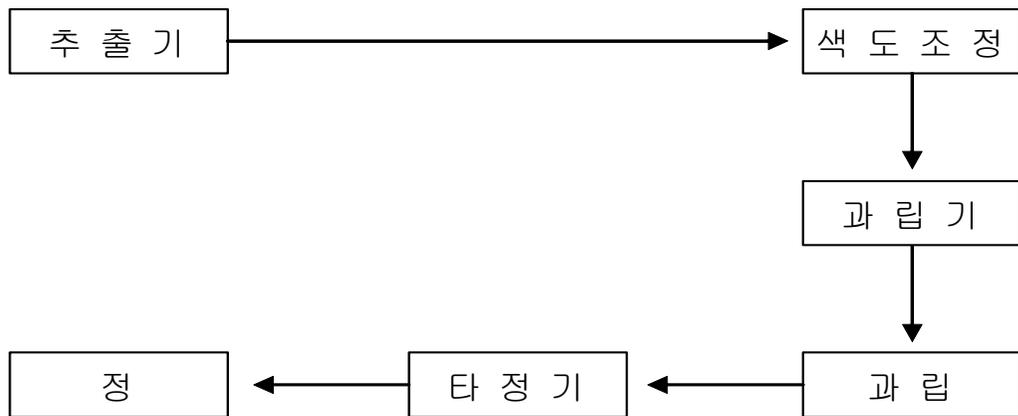


Fig. 16. 정유 성분을 이용한 타정의 제조과정



Fig. 17. 정유 성분을 이용한 타정 제조에 사용된 타정기의 모습

4) 대상 정유를 이용한 파우치 제조

초임계 장치를 이용해 추출한 향기성분의 기능성을 평가하기 위해 인진쑥 추출물에 정유 성분을 첨가하여 파우치를 제조하였다. 이를 위해 인진쑥 추출물 제조를 위해 증류수를 이용하여 100℃에서 48시간 추출하였다. 불순물을 제거한 후 감압농축기를 이용하여 농축한 후 20~30 brix로 추출물을 감압 농축하였다. 이렇게 감압 농축된 추출물에 감미제로 식용 올리고당을 첨가하여 당도를 조절한 후 정유 성분은 총 부피의 0.5%를 첨가하여 잘 교반하였다. 이후 진공 파우치기를 이용하여 파우치 봉지 당 100~150 ml의 혼합용액을 넣고 진공 포장하여 액상 파우치를 제조하였다.

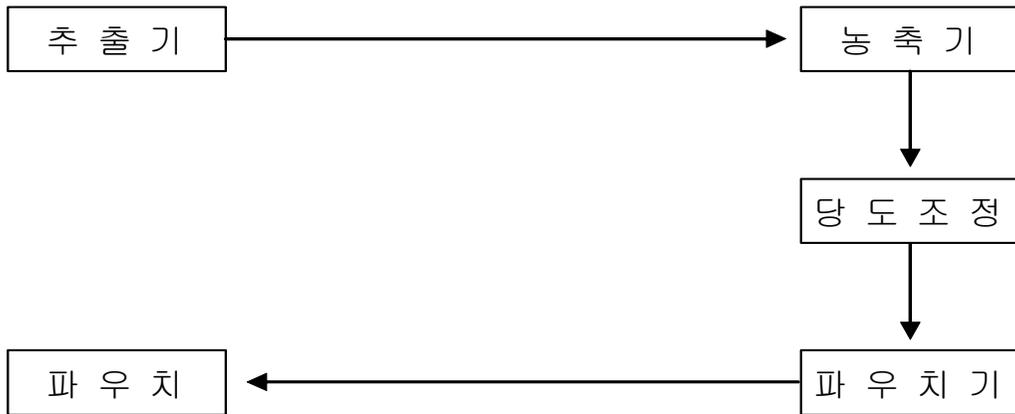


Fig. 18. 정유 성분을 이용한 파우치의 제조과정



Fig. 19. 정유 성분을 이용한 파우치 제조에 사용된 파우치 제조기의 모습

2. 실험 결과 및 고찰

관목자원 정유 성분을 이용해 제품화 적성(성능)을 평가하기 위해 각각의 제품군별로 대학생 30명을 대상으로 Panel Test를 실시하였고 그 결과를 Table 10에 제시하였다.

첫 번째로 정유 성분을 이용하여 만든 제품 중에 환제품은 관능검사에서 낮은 선호도를 나타내었다. 선호도가 낮게 나온 것은 관능검사에 참여한 인원들의 평균연령이 대학생 기준으로 젊은 연령층이기 때문인 것으로 사료되어지며, 맛을 느낄 수 있는 다른 제품과는 달리 기능성식품, 즉 약처럼 먹어야 된다는 선입견 때문에 이런 결과가 나온 것으로 사료되어지는 바이다. 하지만 환을 만드는데 쓰인 재료들을 고려해보면 인진쑥 분말과 정유성분의 두 가지 제품들을 포함하기 때문에 그 기능성은 다른 제품보다 뛰어날 것으로 사료되어진다.



Fig. 20. 제조된 환의 모습

두 번째로 정유 성분을 이용하여 만든 제품 중에 과립은 관능검사를 통해서 비교적 높은 선호도를 나타낸 제품이다. 기존의 유사한 형태의 제품이 피로회복제나 혹은 간식으로 나온 것이 있고, 유아식이나 선식으로 이용하였을 경우 그 효용 가치가 높을 것으로 사료되어진다. 과립을 만드는데 쓰인 재료들을 고려해보면 무수결정포도당과 정유 성분만을 사용하였기 때문에 그 기능성은 다른 제품보다 떨어질 것으로 추측되어진다. 또한 무수결정보도당의 흰색과 정유 성분의 색을 보완하기 위해 식용색소를 사용하여 과립의 색을 보완하였다. 그리고 과립이 갖는 약처럼 보인다는 선입견을 없애버릴 수 있는 제품화 방법을

만든다면 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 사료되어진다.



Fig. 21. 제조된 과립의 모습

세 번째로 정유 성분을 이용하여 만든 제품 중에 정은 관능검사를 통해서 가장 낮은 선호도를 나타내었다. 시판되고 있는 기존의 알약과 가장 유사하게 생긴 제품으로, 관능검사에 참여한 인원들이 약을 싫어하는 대학생의 젊은 연령층이라는 이유에서 이러한 결과가 나타난 것으로 사료되어진다. 과립을 제조하는데 사용된 재료들을 고려해보면 무수결정보도당과 정유 성분만을 사용하여 과립을 제조한 후, 타정기를 이용하여 제조하였기 때문에 그 기능성은 다른 제품보다 떨어질 것으로 추측되어진다. 또한 무수결정보도당의 흰색과 정유 성분의 색을 보완하기 위해 식용색소를 사용하여 과립의 색을 보완하였지만, 타정기에서 정이 제조되면서 과립과는 다른 색을 형성하였다. 이러한 정은 젊은 연령층의 사람들보다는 30~40대나 그 이상의 연령층을 고려하여 제조하는 것이 더 좋은 효과를 나타낼 것으로 사료되어지는 바이다



Fig. 22. 제조된 정의 모습

마지막으로 정유 성분과 인진썩을 이용하여 제조한 제품 중에 파우치 제품은 30명을 대상으로 실시한 관능검사에서 제일 좋은 점수를 받은 제품이다. 인진썩 농축액에 단맛의 감미제인 올리고당을 첨가하여 만든 인진썩 농축액을 이용한 파우치는 감압을 통하여 열의 가열이 적은 것이 특징으로, 인진썩이 추출될 때 기능성 성분들의 파괴가 적은 것이 큰 특징이며, 특히 관능검사에서 가장 좋은 점수를 받을 수 있었던 점은 부담 없이 음료처럼 마실 수 있다는 장점 때문인 것으로 사료되어진다. 이러한 장점을 이용하여 인진썩의 기능성을 갖는 음료의 개발을 시도한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되어지는 바이다.



Fig. 23. 제조된 파우치의 모습

Table. 10. The results of panel test of each functional products.

		Tastes			Total
		High	Middle	Low	
Pill	<i>J. rigida</i> fruit	13	15	2	30
	<i>J. rigida</i> trunk	10	13	7	
	<i>B. cartei</i> fruit	13	11	6	
	average	12	13	5	
Granule	<i>J. rigida</i> fruit	17	9	4	30
	<i>J. rigida</i> trunk	14	13	3	
	<i>B. cartei</i> fruit	14	12	4	
	average	15	11	4	
Tablet	<i>J. rigida</i> fruit	9	16	5	30
	<i>J. rigida</i> trunk	8	12	10	
	<i>B. cartei</i> fruit	10	17	3	
	average	9	15	6	
Pouch	<i>J. rigida</i> fruit	17	11	2	30
	<i>J. rigida</i> trunk	14	13	3	
	<i>B. cartei</i> fruit	17	12	1	
	average	16	12	2	

- 경제성 평가 -

초임계 추출 장치를 이용하여 추출한 향료의 우수성은 잘 알려져 있으며 현재 향료 시장에서 고가의 수입품들이 유통되고 있다. 초임계 추출 향료를 생산하기 위하여서는 먼저 초임계 추출에 필요한 고압의 추출 및 분리장치를 설치하여야 하며 막대한 고정 자본의 초기 투자가 커다란 부담요인으로 인식되고 있다. 따라서 설비를 투자하여 생산하는 방안과 기존의 설비를 임차하여 사용하는 방안과 초임계 유체 추출에 의한 향료의 생산 시, 향료 자체만을 생산하기 보다는 생산된 향료를 기존의 기능성 식품의 재료나 첨가물로 사용하였을 경우를 표 11과 표 12에서 살펴보았다.

표 11에서는 초임계 유체 추출장치를 구입하는 경우와 임차하는 경우를 상대적으로 비교하여 경제성을 분석한 것으로 초임계 유체 추출장치를 구입하지 않고 (재)춘천바이오산업진흥원에 있는 장치를 임차하여 사용할 경우, 고정자본 비용은 별도로 들지 않고 임차비를 매월 지불하게 된다. (재)춘천바이오산업진흥원에 설치되어 있는 초임계 유체 추출장치(5 ℓ 용량)의 경우의 임차료(시간당 3000원)를 적용하면 하루 8시간 작업 시 10 ℓ의 시료를 처리할 수 있으며, 연간 처리량은 3,000kg이고 임차료는 7,200,000원이다. 기기의 구입비(설치료 포함)는 16,000,000원으로 임차료만 적용하였을 경우 향후 3년 이내에는 흑자를 생각할 수 있다고 사료된다.

또한 표 12에서는 기능성 식품으로 알려진 인진숙 파우치에 초임계 추출 장치를 이용하여 추출한 향료를 첨가한 제품을 판매하는 것과 기존의 향료의 무첨가 제품의 판매를 비교한 것으로, 향료 무첨가 제품에 비하여 향료 첨가 제품의 생산이 1회 생산으로 400,000원의 이익이 발생한다.

이상의 결과를 살펴보면 초임계 추출 장치를 구입 설치하여, 다품종 소량생산에 의하여 향료를 국내 시장의 판매를 시도하면서 기술 축적 및 세계화를 모색하고, 생산된 향료를 기능성 식품 등에 첨가하여 고부가가치의 제품을 생산하는 것이 바람직한 전략으로 사료되어지는 바이다.

Table 11. 초임계 추출장치의 기기 구입에 관한 경제성 평가

항 목	기기 구입시	기기 임차시
기계구입비(설치비포함)	16,000,000	-
임차료	-	7,200,000
전기	320,000	320,000
소계	16,320,000	7,520,000

Table 12. 생산된 정유의 활용에 대한 경제성 평가

항 목	향료 첨가 제품	향료 무첨가 제품
원 료 비	720,000	520,000
인진숙	320,000	320,000
향 료	200,000	-
기타 부재료	200,000	200,000
전 기	36,000	36,000
	(300 kw x 120원/kw)	(300 kw x 120원/kw)
생 산 량	600 Box	600 Box
	(80 ml x 30포)	(80 ml x 30포)
인 건 비	200,000	200,000
	(50,000원 x 4명(일용직))	(50,000원 x 4명(일용직))
관 매 가	4,200,000원	3,600,000원
	(7,000원 x 600 Box)	(6,000원 x 600 Box)
포장 재료비	1,600,000	1,600,000
이 익	1,644,000	1,244,000

제 3 절 관목자원의 정유내 성분의 생리 활성 탐색

1. 실험내용

가. 항암 활성 및 세포 독성 측정

1) 세포주 및 배지조성

본 실험에 이용된 세포주는 1차 년도에 생리활성 측정을 위해 이용한 암세포로는 인간 간암세포인 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 폐암세포인 A549(Lung carcinoma, human), 인간 위암세포인 AGS(stomach adenocarcinoma, human), 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)을 사용하였고, 치료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 간세포인 WRL68(Human embryo liver)을 사용하였고, 2차 년도에는 실험 대상 세포인 A549, AGS, HEL299 세포를 사용하였으며, 마지막 3차 년도에는 Hep3B, MCF7 세포를 사용하였고, 그중 Hep3B, MCF7, WRL68은 DMEM배지를 A549, AGS는 RPMI 1640배지에서 10% heating-inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 적응시켜 배양하였다.

2) MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay는 생세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 세포의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 100 μ l씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100 μ l의 MTT(50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 μ l를 첨가하여 formazan을 다시 용해시킨 후, 각 well에서 100 μ l씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, THERMO max)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

3) SRB assay

SRB (sulforhodamine B)assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을

측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 WRL68, Hep3B, MCF7(10% FBS, DMEM배지)와 AGS, A549(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cell/ml으로 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배지 (37°C , 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종 농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(tri chloroacetic acid) $100\mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 상온에서 30분동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10mM Tris buffer $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Selectivity 측정

SRB assay를 이용하여 정상 세포에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, 또한 각 암 세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암 세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \text{암세포 생육 억제 활성} / \text{정상 세포에 대한 세포 독성}$$

나. 항돌연변이원성 측정

실험에 사용된 세포주는 Chinese hamster lung cell(CHO V79 strain)로 이 세포주는 Ford와 Yerganian에 의해 어린 hamster의 lung에서 분리되어진 21개의 염색체를 갖는 karyotype(chinese hamster, $2n=22$)이다. 항 돌연변이원성을 측정하기 위하여 6TG-resistant cell을 5×10^2 cells/ml의 농도로 24 well plate에 접종하여 24시간 배양 후 배지를 교체하여 주고, 여러 시료와 대조구인 4NQO를 농도별로 투여한 다음 3시간 후 배지를 교체하여 주었다. 36시간 배양한 후 $5\mu\text{g/ml}$ 의 6TG를 포함하는 배지로 교체하여 48시간 더 배양한 뒤 MTT방법에 의하여 실험군의 항 돌연변이 원성을 측정하였다.

다. 간기능 관련 생리 활성측정

1) 해독작용 - Glutathione S-transferase 측정

정유의 해독작용 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST (glutathion - S - transferase)의 활성을 측정하였다. 조제된 반응시약에 대조구로 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2,4dinitro benzene을 첨가한 후 다시 37℃에서 2분간 반응시켰다. 반응후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심분리한 후 상등액을 340nm에서 흡광도를 측정한 뒤 다음과 같이 GST의 specific activity와 활성율을 계산하였다.

$$\text{Total activity (units)} = (A_{340}/9.6) \times \text{희석배수} \times (3\text{ml}/0.1) \times \text{crude extract(ml)}$$

$$\text{Specific activity (units/ml protein)} = \text{total activity} / \text{total protein}$$

$$\text{활성율 (\%)} = \text{specific activity}_{\text{test}} / \text{specific activity}_{\text{control}} \times 100$$

라. 신경세포의 생육촉진 활성 측정

각 시료의 신경분화 활성측정을 위해 pheochromocytoma(PC12) 신경세포주를 이용하였다. 10% FBS를 함유한 RPMI 1640의 기본배지에서 배양된 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 배양 flask로부터 떼어낸 후 7.5×10^2 viable cells/well의 농도로 24 well plate에 900 μl 를 접종하였다. 접종 24시간 후에 각 시료를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0g/L의 농도로 100 μl 를 첨가하여 36.5℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 현미경 (Olympus: IMT2-RFC, JAPAN)을 이용하여 시료첨가 후 배양기간에 따른 세포의 생장을 관찰하였다.

마. 면역세포에 대한 생육도 평가 및 TNF- α , IL-6 분비량 측정(bioassay kit 사용)

Mono-clonal anti-mTNF- α , IL-6가 pre-coating 되어 있는 96-well plate에 50 μl 의 dilution buffer를 넣고 1×10^4 cells/ml 로 배양된 각 세포에 시료를 첨가하여 배양한 후, 48시간 간격으로 상층액 50 μl 를 분취하여 가한 후에 시료 내에 존재하는 TNF- α , IL-6와 결합시켰다. 시료 첨가 후 37℃에서 3시간 가량 반응시킨 후, washing buffer로 4회 수세하여 결합되지 않은 물질을 제거시켰다. Peroxidase- conjugated polyclonal

anti-mTNF- α , IL-6 antibody를 첨가하여 mTNF- α , IL-6와 결합시켰다. 결합하지 않은 물질을 제거하기 위하여 microplate를 4회 수세하고, 기질액을 가하여 peroxidase와 촉매반응을 유도시켜 발색시킨 후 효소의 반응을 정지시키기 위하여 100 μ l의 반응 정지액을 넣었다. 반응 정지 후 30분 이내에 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 또한 각 well의 cell들을 hemacytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

바. 세포사멸 형태 측정

염색시약은 Ca²⁺와 Mg²⁺이 없는 PBS에 acridine orange와 ethidium bromide를 각각 100 μ g/ml가 되도록 녹였다. 이 두 용액을 섞고 세포농도가 $5 \times 10^{5-6}$ cells/ml가 되는 세포 현탁액 100 μ l에 염색시약 4 μ l를 첨가했다. 이 후 형광현미경(OLYMPUS : IMT2-RFC, JAPAN)으로 $\times 200$, $\times 400$ 배의 배율로 세포를 관찰하여 apoptosis와 necrosis를 나타낸 세포수를 counting 하였다.

사. Natural killer cell 활성화 측정

NK-92MI cell을 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myo-inositol, 20 mM folic acid, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum(FBS)와 12.5% horse serum(Myelocult)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T 세포를 T-25 flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취한다. NK-92MI cell을 24 well plate에 $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 900 μ l씩 분주하고 24시간 후 인간 T 세포의 상층액을 각 plate에 100 μ l씩 투여하여 배양 48시간 후 NK-92MI cell의 활성도를 Hemocytometer를 이용하여 생세포수를 측정하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다.

아. HL-60 세포를 이용한 분화도 측정

HL-60(human promyelocytic leukemia) 세포를 4×10^5 cells/ml의 농도로 24 well plate에 1 ml 접종하여 전 배양하였다. 24시간 간격으로 배지를 제거한 후 세포를 수확하여 320 x g에서 10분간 원심 분리하여 침전시킨 다음, 200 μ l의 0.1% Triton X-100을 넣어 37°C에서 30분간 용해시켰다. 일정량의 용해액과 0.1% Triton X-100을 20 μ l 되게 96 well plate에 옮기고, 3 mg/ml의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer(pH 0.5)를 100 μ l넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 0.1 N NaOH 100 μ l를 첨가한 후, microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다

자. Mice를 이용한 in vivo 항암 실험

1) 실험동물 및 세포주

Japan SLC에서 female mice(4주령, 22~24 g, ICR)를 구입하여 사용하였다. 사육장은 20~25℃의 온도와 55±10%의 습도를 유지시켰으며, 12시간마다 점등하였다. 케이스는 살균 처리하여 1/3 정도 깔짚으로 채워 사용하였다. 사료는 고형 사료로 자유급식을 하였다. 물은 살균 처리하여 자유급식을 하였다. Mice는 약 1주일 정도 적응시켜 실험을 시작하였다. 실험에 사용된 세포주는 Sarcoma 180(ATCC : CCL 8, USA)을 사용하였다.

2) S-180 복수암의 항암효과 실험

10% FBS를 함유한 RPMI 1640의 기본배지에서 배양된 세포를 0.25% trypsin- EDTA로 배양 flask로부터 떼어낸 후 2×10^6 cells/mouse의 농도로 하여 50~200 μ l 정도 복강에 1 ml syringe를 이용하여 피하이식 하였다. 시료는 종양세포 이식 후, 3~6일 동안 정해진 급여량(50~100 mg/kg)을 나누어 사료에 혼합하여 급식하도록 하였다. 암세포의 접종일로부터 20일간 mouse의 체중을 매 2일마다 측정하였으며, 50일까지 생존일을 관찰하여 생존율(survival rate)을 계산하였다.

$$\text{Survival rate(\%)} = \frac{\text{Mean survival days of treated mice}}{\text{Mean survival days of control mice}} \times 100$$

3) 실험군

실험군은 다음과 같이 복수암을 유발시키지 않고 사료만 먹인 group(standard control group), 복수암 유발 후 사료만 먹인 group(control group), 복수암 유발 후 sample을 먹인 group(treated samples group)의 3가지 군으로 분리하여 실험을 수행하였다. Sample 급여량은 50~100 mg/kg의 양으로 사료에 섞어 자유급식을 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 항암 활성 및 세포 독성 측정

1) 세포독성 (human normal cell, WRL 68)

연구 1년차에는 각 수목으로부터 추출한 각각의 정유 성분을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L의 농도로 투여하여 각 세포주에 대한 생육 저해능을 알아보았다.

Table 13. Cytotoxicity of the essential oils from several plants on the human normal cell, WRL 68

Sample	Dose (mg/ml)	Cell line
		WRL68
노간주나무	0.2	5.8
	0.4	6.7
	0.6	8.9
	0.8	9.5
	1.0	10.6
회 향	0.2	9.4
	0.4	14.7
	0.6	17.3
	0.8	18.0
	1.0	19.0
유 향	0.2	8.8
	0.4	9.2
	0.6	10.4
	0.8	10.3
	1.0	15.1
막총나무	0.2	7.3
	0.4	9.2
	0.6	10.8
	0.8	12.1
	1.0	11.4
참빗살나무	0.2	8.6
	0.4	10.3
	0.6	13.0
	0.8	14.3
	1.0	16.3
참빛나무	0.2	9.7
	0.4	11.6
	0.6	12.1
	0.8	13.9
	1.0	15.8
백단목	0.2	11.6
	0.4	13.8
	0.6	13.9
	0.8	16.8
	1.0	18.9
장 미	0.2	10.6
	0.4	12.5
	0.6	14.7
	0.8	15.4
	1.0	16.8

2) 향암 (Breast adenocacinoma. MCF7)

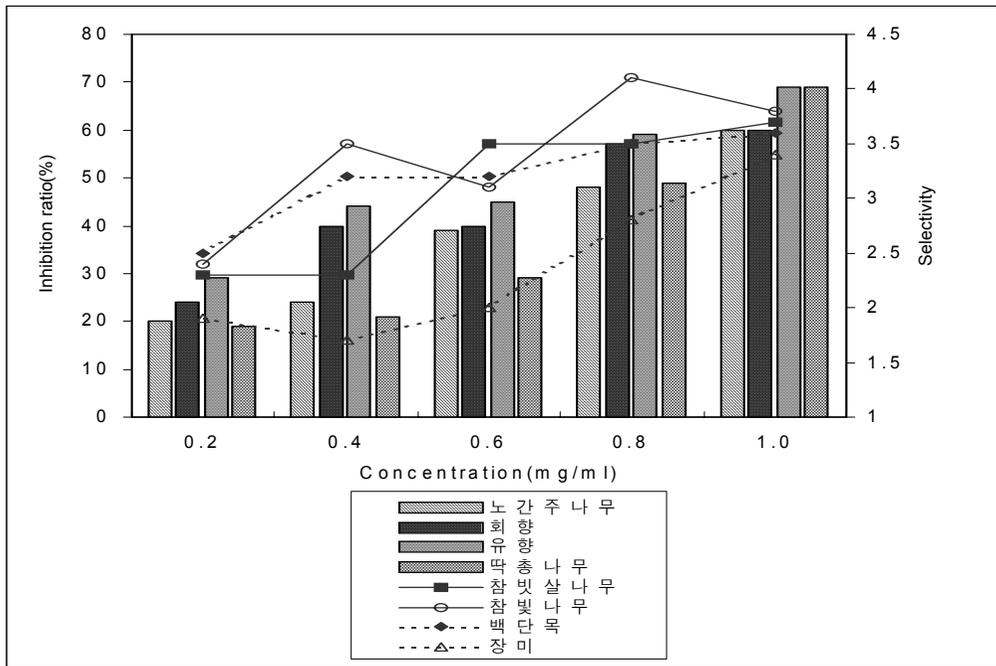


Fig. 24. Inhibition ratio of growth breast adenocacinoma. MCF7 and selectivity in adding the essential oil from several plants.

Fig. 24.는 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human) 을 사용하였고, 시료 자체의 향암과 세포 선택성을 알아본 결과, 3종의 관목 정유 성분의 향암 실험에서 3종의 정유 성분 모두 농도에 많을수록 암세포의 억제 효과는 비례적으로 높았으나, 그중 노간주의 정유 성분이 1.0에서 가장 높은 (약 55%) 억제 효과를 보였다. 또한 세포 선택성에서는 딱총 나무의 정유 성분의 경우 전 농도에서 매우 높은 선택성(약 3이상)을 보였고, 다른 두 종의 경우도 꽃 농도에서는 각각 2.8 이상의 선택성을 보였다. 각각의 정유성분의 최종 농도(1.0) 에서는 노간주 나무의 세포 선택성이 다른 2종의 정유 성분보다 높음을 알 수 있었다. 이상으로 향암세포의 선택성이 우수하고 암세포의 억제 효과가 뛰어난 노간주 나무의 정유 성분의 분리 정제 후 상품성을 확인 할 수 있었다.

3) 항암 (위암 AGS)

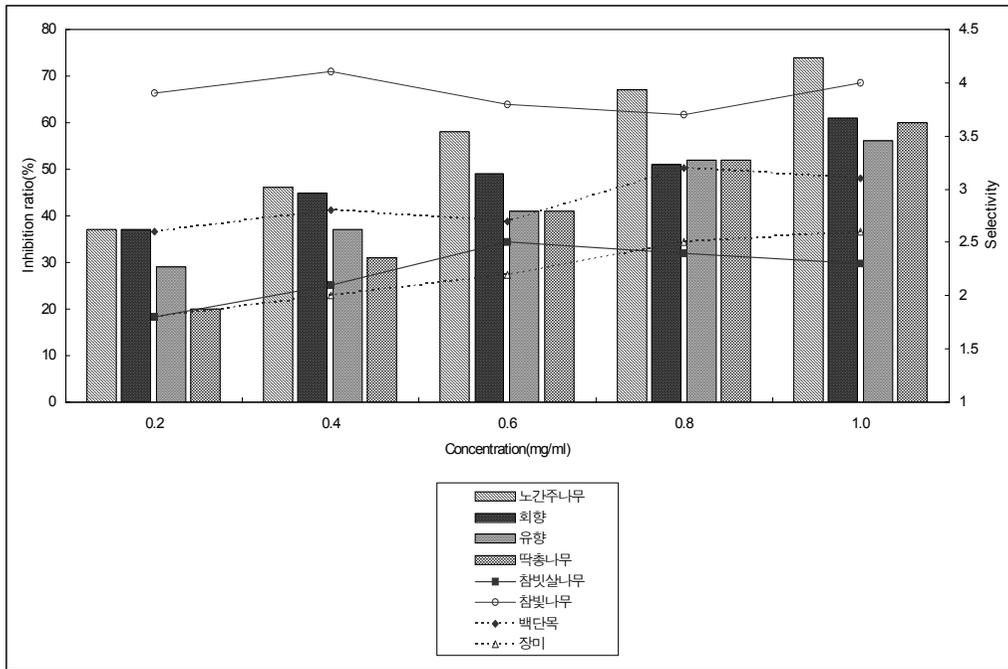


Fig. 25. Inhibition ratio of growth of stomach adenocarcinoma, AGS and selectivity in adding the essential oil from several plants

Fig. 25.는 정유 성분 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 간 세포인 WRL68(Human embryo liver)을 사용하였다. 그림의 결과에서 보듯 정상 세포의 독성은 3종의 정유 성분 모두 다소 낮은 세포 독성을 보였다. 특히 노간주의 시료의 경우는 1.0 농도에서도 세포의 독성이 약 11%로 매우 낮았다. 이상으로 세포의 독성이 10% 미만을 기준으로 본다면 노간주의 정유 성분이 약 0.8의 농도일 경우 세포의 독성은 약 10%, 암세포의 억제율은 50%, 세포의 선택성은 2.8 정도로 매우 괄목한 만한 결과를 나타냈으며, 이의 추가 세부 연구를 통하여 단일의 상품화 가능성을 제시하였다.

4) 항암 (간암, hepatocellular carcinoma, Hep3B)

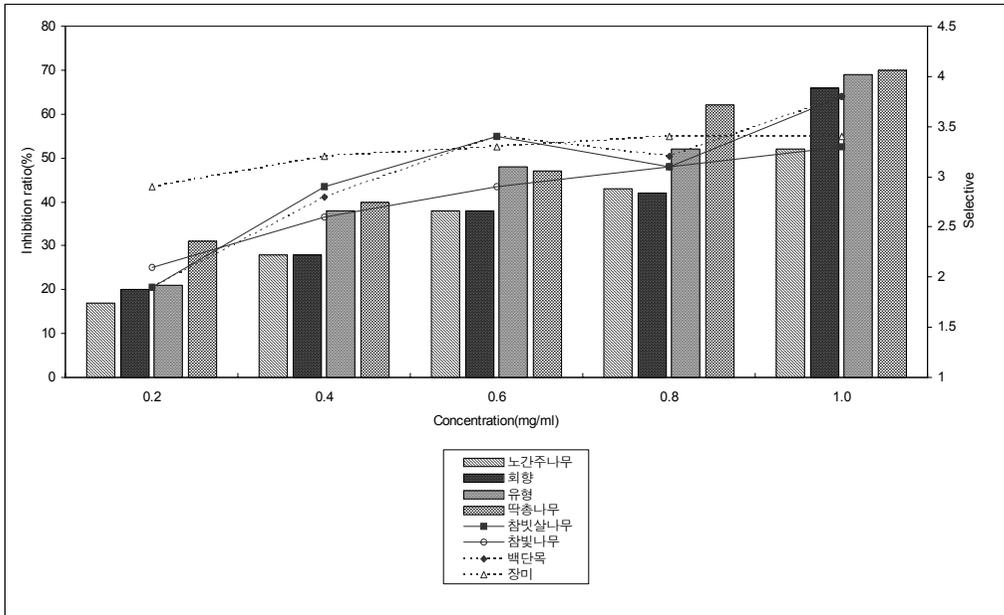


Fig. 26. Inhibition ratio of growth hepatocellular carcinoma, Hep3B and selectivity in adding the essential oil from several plants

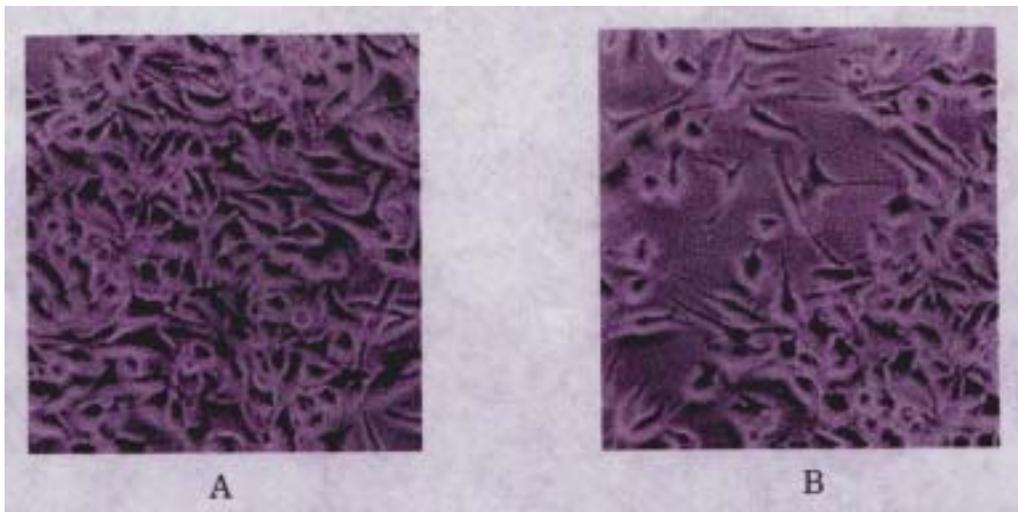


Fig. 27. Comparison of inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma, Hep3B in adding or adding the essential oil from *Juniperus rigida*.

A: no addition, B: 1.0 mg/ml of essential oil from *Juniperus rigida*.

연구 2년차에는 각 수목으로부터 초임계 추출한 각각의 정유 성분을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L의 농도로 투여하여 A549(폐암 세포주)와 AGS(위암 세포주)에 대한 생육 저해능을 알아보았다. 먼저 Fig. 28.에서는 폐암 세포에 대한 억제능을 알아보았는데 저농도인 0.4, 0.6 g/L의 농도에서는 유향이 60%내외로 좋은 억제능을 보였지만 최대농도 1.0 g/L에서는 회향과 화살나무가 70~80%로서 다른 시료에 비해 높은 억제능을 보여주었다. Fig. 29는 위암세포에 대한 억제능을 나타낸 그림으로 모든 시료가 농도 의존적인 저해능을 보여주었다. 그 중 가장 높은 저해능을 보인 것은 회향과 화살나무로서 최대농도인 1.0 g/L에서 약 80%로서 다른 시료들에 비해 보다 높은 암세포 저해능을 보여주었다. 위 실험을 통해 암세포에 대해 높은 저해능을 보인 수목을 확인할 수가 있었는데, 그 수목은 화살나무와 회향으로서 다른 두 수목보다 높은 암세포 저해능을 확인할 수가 있었다.

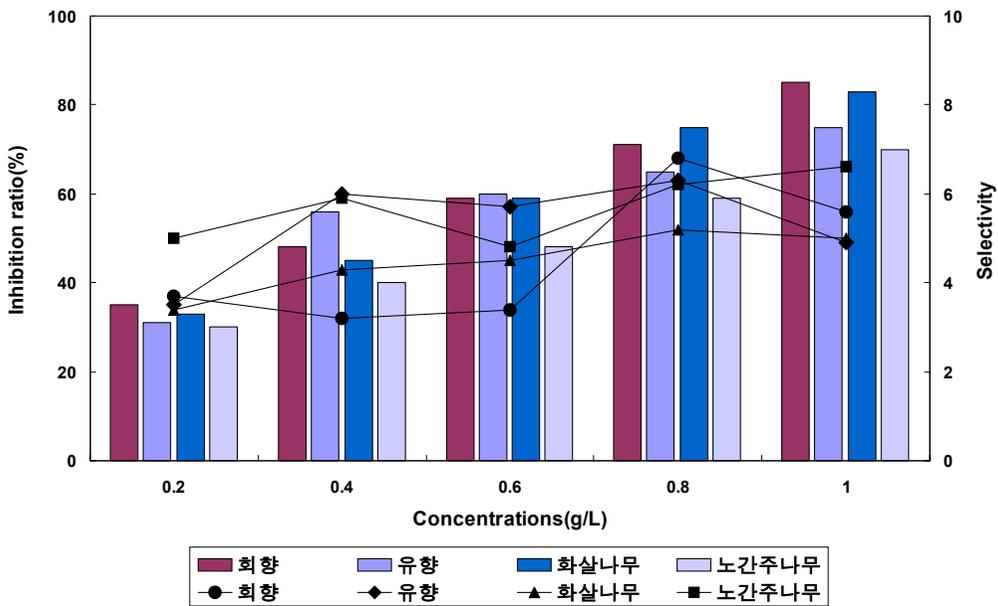


Fig. 28. Inhibition ratio of growth of lung carcinoma, A549 in adding the samples.

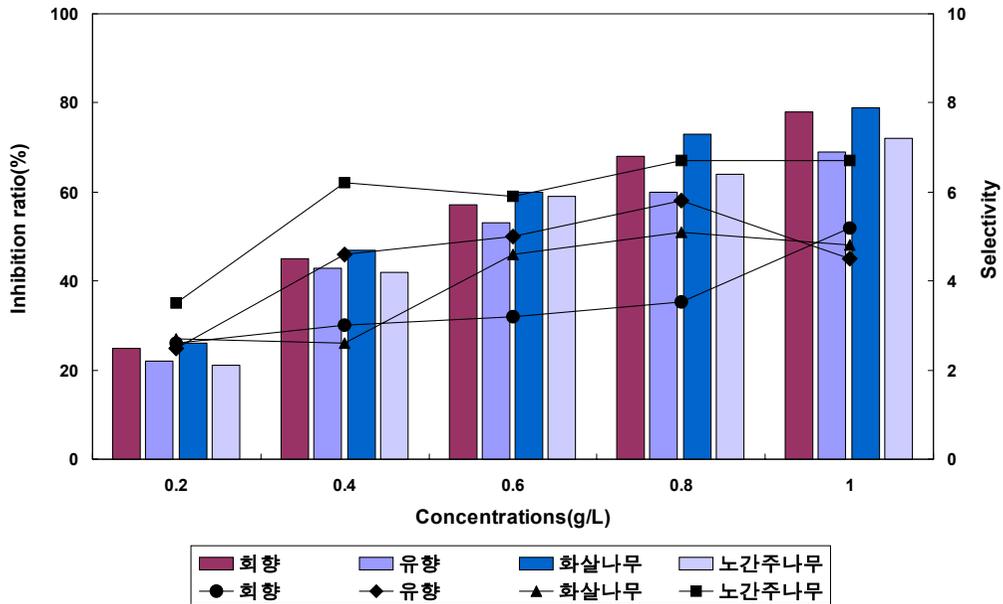


Fig. 29. Inhibition ratio of growth of stomach adenocarcinoma, AGS in adding the samples.

최종 3년차 연구에서는 각 시료로부터 초임계 추출한 각각의 정유 성분들의 유방암 세포인 MCF-7 (Brest adenocarcinoma, human, ATCC, USA)와 간암 세포인 Hep3B(Hepato- cellular carcinoma, human, ATCC, USA),에 대한 생육 저해능을 알아보았으며, 그 결과들은 Fig. 30.과 Fig. 31.에 각각 나타내었다.

우선 유방암 세포인 MCF-7에 대한 각 정유 성분들의 암세포 생육 저해능을 살펴보면, 각각의 정유 성분들을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l의 농도로 투여하였다. 각 정유 성분의 투여량이 증가하면서 암세포의 생육 저해능이 증가하는 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 가장 활성은 높은 시료는 노간주 열매의 정유 성분으로 0.6 g/l 농도에서부터 약 80%의 높은 생육 억제 활성을 나타내었으며, 또한 1.0 g/l의 농도에서 약 84%의 높은 생육 억제 활성을 나타내었다. 노간주 줄기의 정유 성분과 유향 열매의 정유 성분은 시료 투여 최고 농도인 1.0 g/l의 농도에서 각각 79%와 78%의 높은 암세포 생육 억제 활성을 나타내었다. 간암 세포인 Hep3B에 대한 각 정유 성분들의 암세포 생육 저해능은 유방암 세포의 경우와 같이 투여한 정유 성분의 양에 따라 암세포의 생육 저해능이 증가하는 농도 의존적인 경향을 나타내었으며, 가장 활성이 높은 시료는 유

향 열매의 정유 성분으로 1.0 g/ℓ의 농도에서 약 83%의 높은 암세포 생육 억제 활성을 나타내었고, 노간주 열매의 정유 성분 또한 1.0 g/ℓ의 농도에서 약 80%의 높은 생육 억제 활성을 나타내었다. 노간주 줄기의 정유 성분은 1.0 g/ℓ의 농도에서 약 75%의 생육 억제 활성을 나타내었다.

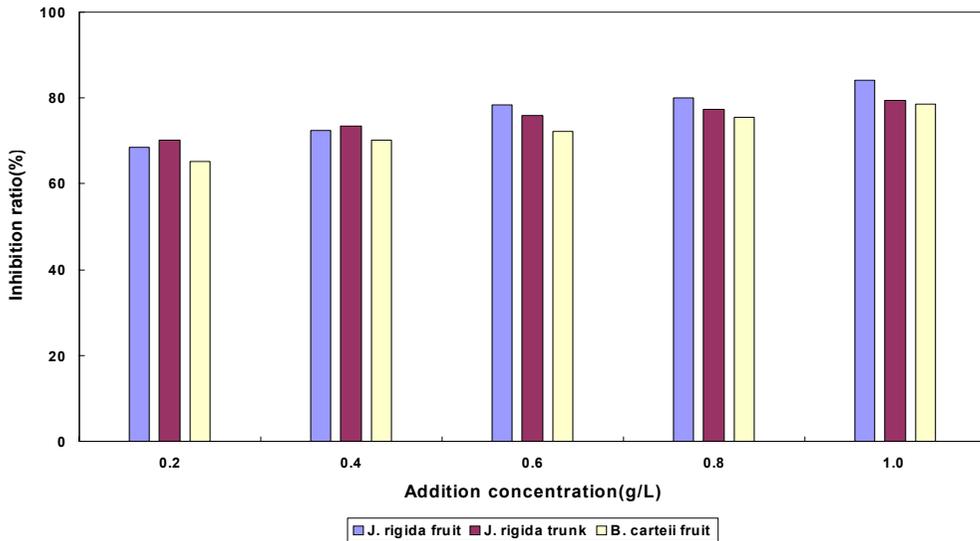


Fig. 30. The ratio of inhibition the growth(bar chart) of Brest adenocarcinoma, human(MCF-7) in adding the sample.

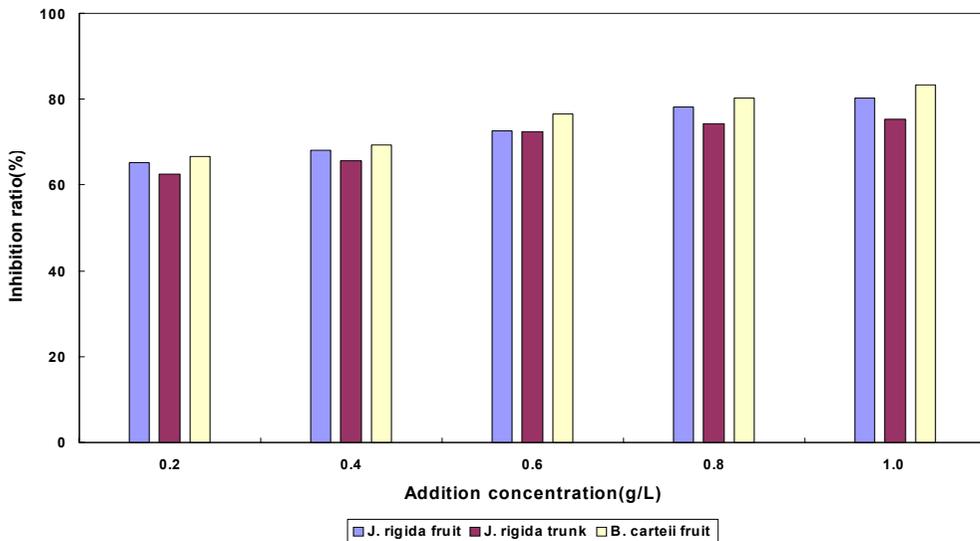


Fig. 31. The ratio of inhibition the growth(bar chart) of Hepatocellular carcinoma, human(Hep3B) in adding the samples.

나) 항돌연변이원성 측정 결과

Table 14. Anti-mutagenic effects of the essential oils from several plants by using CHO V79 cell line treated with 4-NQO(5×10^{-8} M).

Sample	Dose (mg/ml)	Inhibition ratio
		Compared to the control (%)
노간주나무	0.2	9.8
	0.4	10.6
	0.6	14.2
	0.8	16.4
	1.0	20.6
회 향	0.2	10.7
	0.4	15.3
	0.6	18.7
	0.8	26.5
	1.0	29.8
유 향	0.2	28.6
	0.4	33.4
	0.6	42.5
	0.8	46.7
	1.0	50.3
딱총나무	0.2	18.6
	0.4	23.5
	0.6	25.7
	0.8	28.2
	1.0	30.5
참빗살나무	0.2	25.7
	0.4	31.5
	0.6	36.7
	0.8	41.4
	1.0	53.6
참빛나무	0.2	13.6
	0.4	18.7
	0.6	21.4
	0.8	28.7
	1.0	32.4
백단목	0.2	10.7
	0.4	15.6
	0.6	20.5
	0.8	26.7
	1.0	29.8
장 미	0.2	17.8
	0.4	25.6
	0.6	37.8
	0.8	40.5
	1.0	45.6

연구 1년차에서는 여러 관목자원들의 정유성분을 이용하여 돌연변이억제율을 살펴본 후 그 결과를 Table 14.에 나타내었고, 이를 바탕으로 차기년도에는 대상 작목을 4가지로 좁히게 되었고, 연구 2년차에서 각 초임계 정유추출물과 돌연변이원인 4-NQO와 혼합 처리하여 돌연변이 억제율을 살펴본 결과는 Table 15.에 나타내었다. 먼저 억제율은 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 가장 높은 억제율을 보인 것은 화살나무로 최고 농도에서 48%로 나타났고, 유향의 억제율이 45.3%으로 나타났다. 항암활성에서도 높은 활성을 보여준 화살나무의 초임계추출물이 항돌연변이원성 측정에서도 좋은 결과를 보여줌으로서 화살나무 추출물은 세포의 변이를 억제시키며 암세포에 대해서는 강한 항암효과를 나타내는 것을 차년도에 실시된 *in vitro* 실험을 통해 확인할 수 있었다.

Table 15. Anti-mutagenic effects of the extracts by supercritical fluid extraction process from each trees by using CHO V79 cell line treated with 4-NQO.

Dose(g/L) Samples	0.2	0.4	0.6	0.8	1
회향	7.5	13.7	17.4	24.5	27.4
유향	15	25.3	28.4	42.4	45.3
화살나무	11.4	16.2	28.3	39.2	48
노간주나무	5.5	13.2	14.5	22.1	25.3

다) 간 기능 개선 생리 활성 측정 결과

Table 16. Enhancement of glutathione-S-transferase activity in adding the essential oils from several plants.

Sample	Dose (mg/ml)	Activation of GST compared to the control (%)
노간주나무	0.2	100.2
	0.4	105.4
	0.6	106.8
	0.8	109.8
	1.0	116.7
회 향	0.2	103.4
	0.4	111.7
	0.6	120.3
	0.8	120.3
	1.0	129.1
유 향	0.2	103.2
	0.4	109.6
	0.6	110.2
	0.8	123.7
	1.0	140.3
딱총나무	0.2	117.8
	0.4	128.6
	0.6	150.3
	0.8	162.4
	1.0	150.8
참빗살나무	0.2	121.4
	0.4	138.6
	0.6	141.9
	0.8	172.1
	1.0	183.6
참빛나무	0.2	120.3
	0.4	137.8
	0.6	149.5
	0.8	152.6
	1.0	162.4
백단목	0.2	125.6
	0.4	112.5
	0.6	151.4
	0.8	143.8
	1.0	152.3
장 미	0.2	112.3
	0.4	132.7
	0.6	113.9
	0.8	153.8
	1.0	152.4

Table 16.은 연구 1년차에서 여러수목의 정유추출물이 간의 중요한 해독기전인 glutathione S- transferase (GST)에 미치는 영향을 조사한 결과이고, Fig. 32.

는 2차년도에 여러 수목의 초임계 추출물이 간의 중요한 해독기전인 glutathione S- transferase (GST)에 미치는 영향을 조사한 실험결과이다. Epoxide, haloalkane, nitroalkane, alkene, aromatic halo-, nitro- 화합물은 glutathione과 conjugation을 일으켜서 비독성 conjugate를 만든다. 여기에 관여하는 효소는 glutathione-S-transferase이며 이 conjugate는 노나 담즙으로 배설된다. 이렇게 GST는 일반적으로 발암 물질을 해독화하는 메카니즘을 가지고 있다고 알려져 있다. 무 첨가군의 활성을 100%로 보았을 때 가장 높은 활성을 보인 것은 화살나무로서 최고 농도(1.0 g/L)에서 약 1.7배로 다른 시료들보다 높은 활성을 나타내었다. 앞의 결과를 바탕으로 화살나무의 초임계 정유추출물은 간의 해독기전에 관여하며 외부 발암물질에 대한 높은 해독작용이 있음을 확인할 수가 있었다.

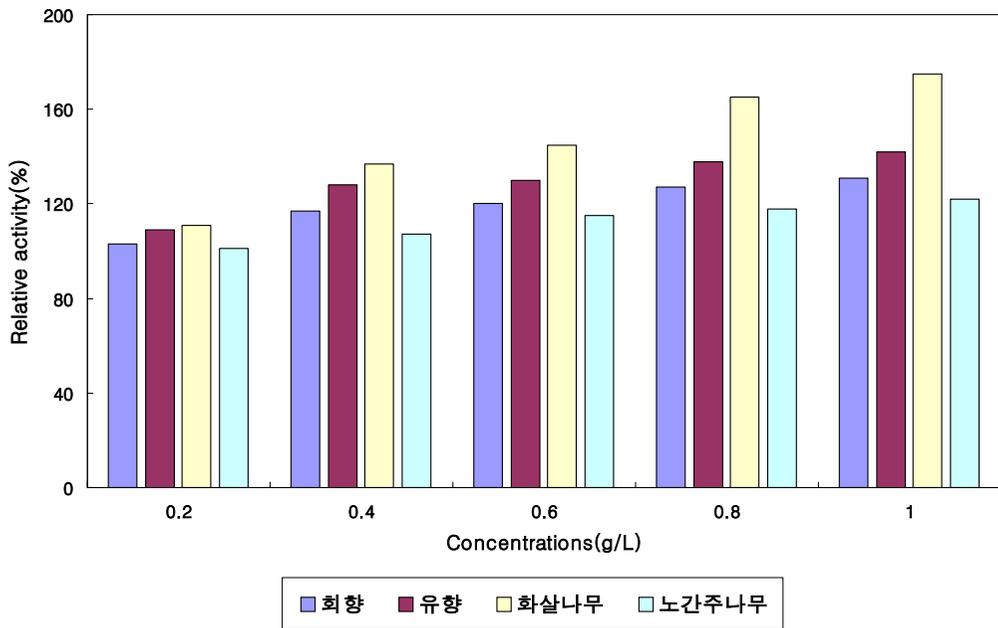


Fig. 33. Enhancement of glutathione-S-transferase activity in adding the essential oils from several plants.

라) 신경 세포의 활성 측정 결과

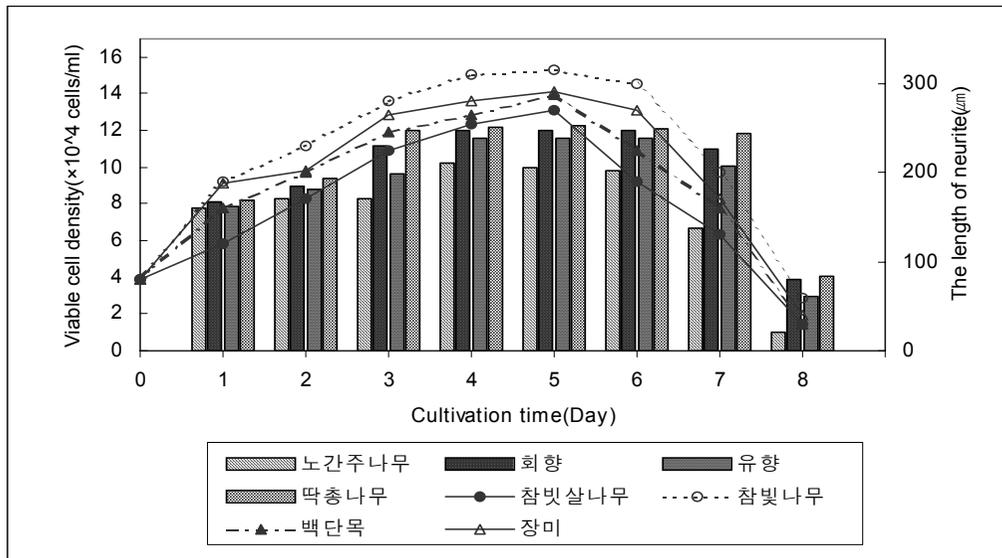


Fig. 33. The growth of viable cell density and neurite's extension of PC12 nerve cells in no adding or the adding the essential oils from several plants to the cultivation time.

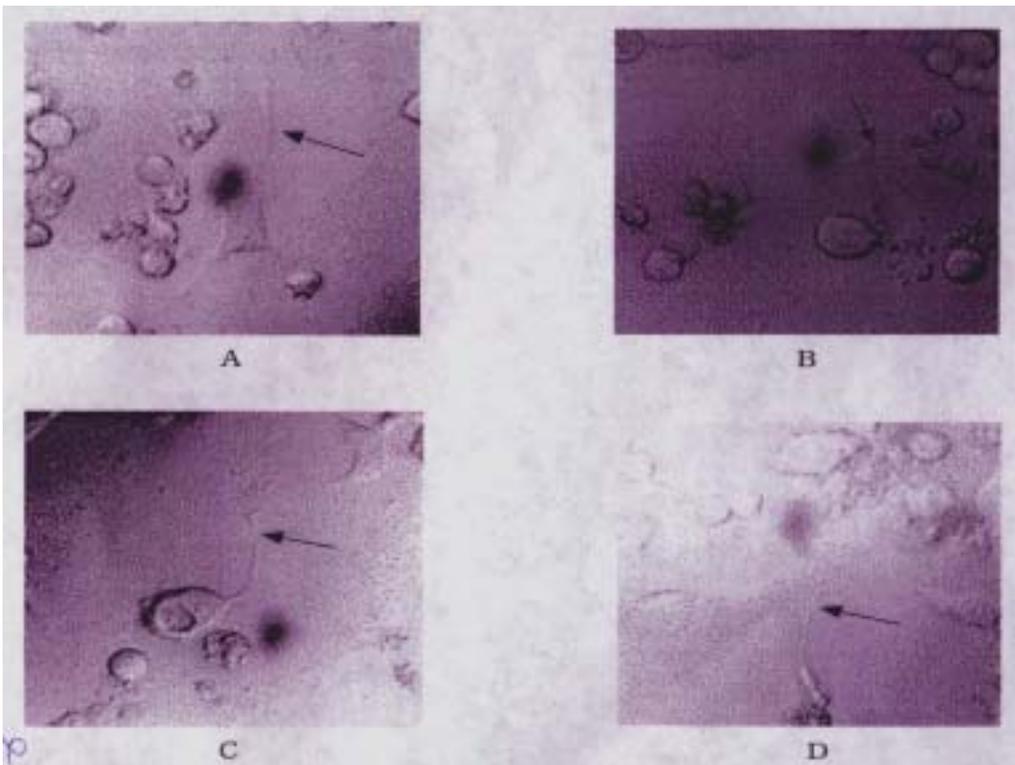


Fig. 33.은 1차년도 연구기간동안 측정된 신경활성 결과를 나타낸 것이고, Fig. 34.와 35.는 연구 2년차 수목의 초임계 추출물에 대한 신경활성 결과를 나타낸 것이다. 먼저 Fig. 34.은 신경세포의 시료 투여에 따른 세포 생육도를 나타내었다. 모든 시료가 농도 의존적으로 생육도가 증가하는 것을 볼 수가 있었다. 그 중 가장 높은 생육도를 보인 것은 회향으로서 9.6×10^3 cells/ml로 다른 시료들보다 높은 생육도를 보였다. 다음으로는 화살나무로 8.7×10^3 cells/ml로 나타났다. 신경 돌기 형성세포와 신경돌기연장에 대한 결과는 Fig. 35.에 나타내었다. 신경 돌기 형성세포에 대한 측정 결과에서도 모든 시료가 농도 의존적으로 생육도가 증가했고, 그 중 가장 좋은 활성을 나타낸 것은 화살나무로 최고 농도(1.0 g/L)에서 4.2×10^3 cells/ml로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 회향으로 4.0×10^3 cells/ml로 나타났다. 또한 신경돌기 연장실험에서도 모든 시료에서 농도 의존적으로 신경돌기가 연장되었다. 가장 좋은 활성을 보인 것은 화살나무로서 $272 \mu\text{m}$ 로 나타나 다른 시료들에 비해 신경돌기 연장능이 높게 나타났다. 이 사실로 기초하여 화살나무의 특정 성분의 신경활성인자의 촉진에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

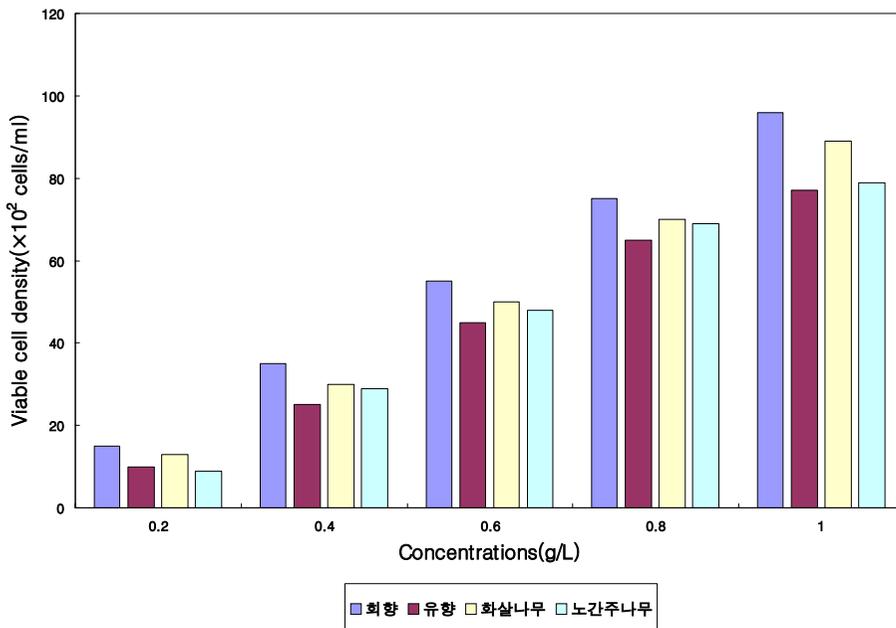


Fig. 34. The growth of viable cell density of PC12 in adding the essential oils.

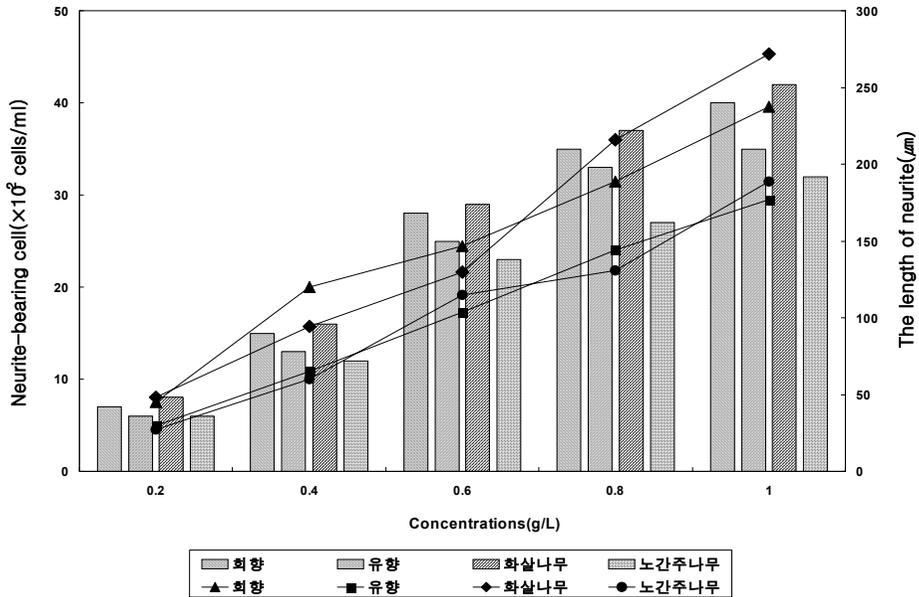


Fig. 35. Neurite-bearing cell density(bar chart) and the length of neurite(line) of PC-12 nerve cells in no adding or adding the essential oils.

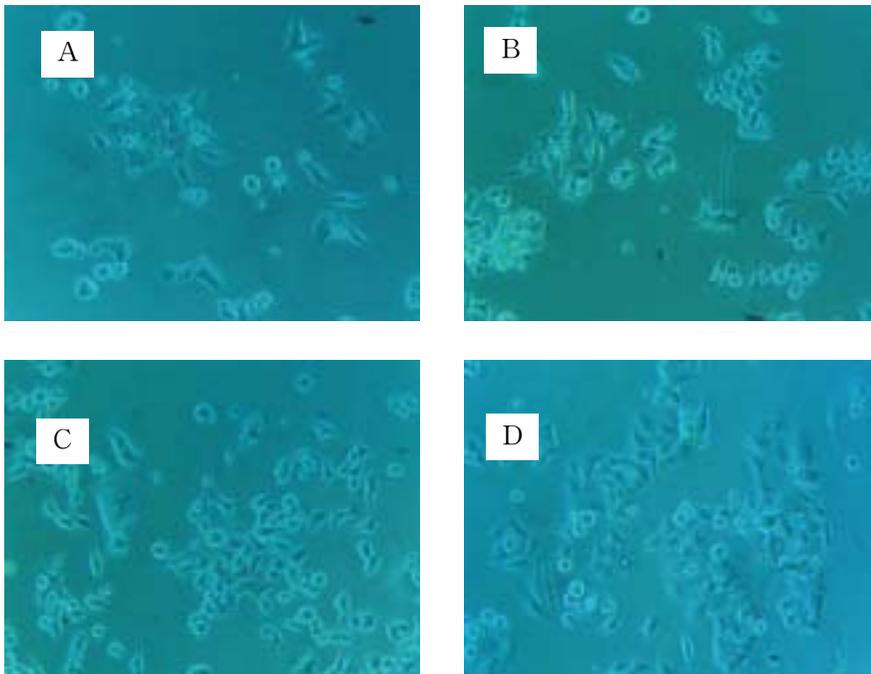


Fig. 36. The morphology of PC12 nerve cells neurite in adding the essential oils from *F. vulgare*(A) or *B. cartei*(B), *J. rigida*(C) and *E. Alatus*(D) after 4th days cultivation.

마) 면역세포에 대한 생육도 평가 및 TNF- α , IL-6 분비량 측정

면역활성 측정 실험은 1차년도와 3차년도에 각각 해당 Sample 들을 이용해서 실시하였다.

1) 면역 증진 측정 결과

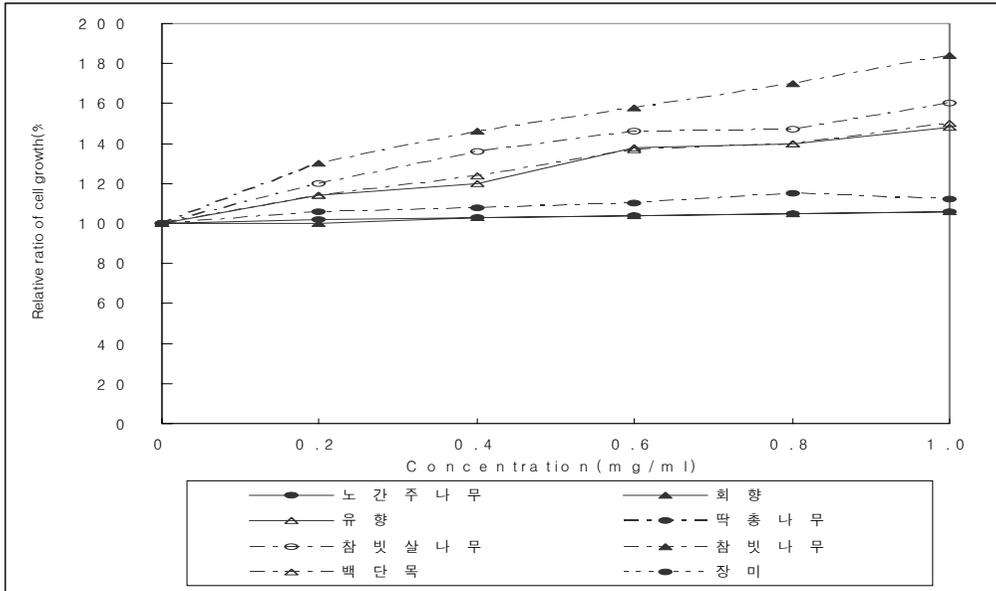


Fig. 37. The effect of the essential oils on the growth of hyman T cell (Jurkat)

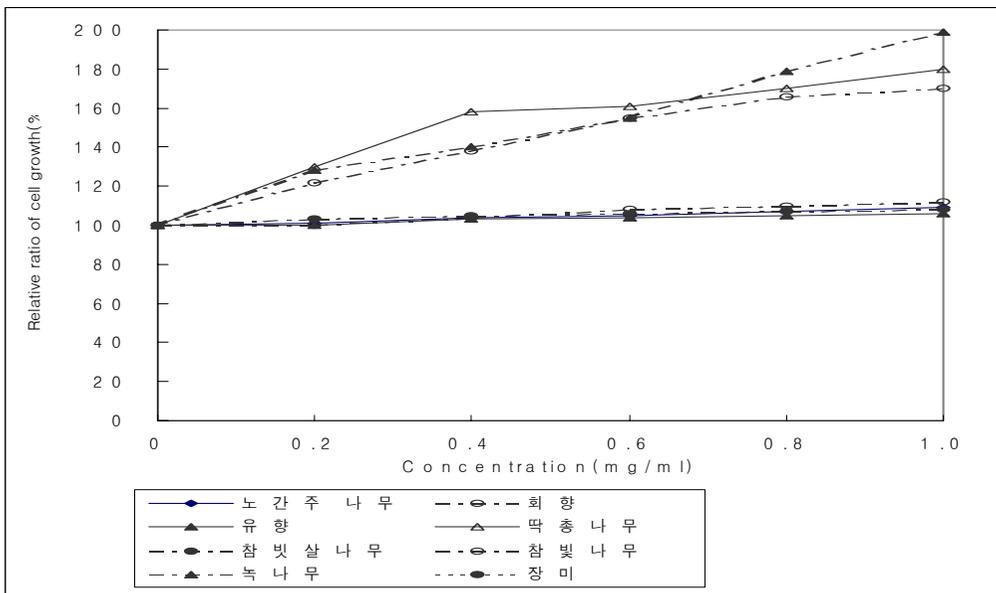


Fig. 38. The effect of the essential oils the growth of human B cell (Raji).

1차년도 연구에서는 면역 증강 효과를 측정하기 위해 인간 면역 세포인 hyman T cell (Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다.(Fig. 37., Fig. 38.) 3종의 정유 물질 모두 농도의 증가에 비례하여 면역 세포의 성장률이 증가하였으며, 노간주의 정유 물질의 경우 0.2 이상의 농도에서는 매우 높은 비율로 면역 세포의 성장을 높였다.

2) Cytokine 측정

Table 17. The quantity of secretion of IL-6 and cell density from human T cell in adding samples.

Sample	Cultivation time (DAY)	Cell density ($\times 10^4$ /mL)	Quantity of secretion of cytokine ($\times 10^{-3}$ pg/cell)	
			IL-6	TNF- α
<i>J. rigida</i> fruit	0	1.0	-	-
	2	3.4	1.77	5.89
	3	6.3	2.90	4.38
	4	4.2	3.15	4.60
<i>J. rigida</i> trunk	0	1.0	-	-
	2	3.1	1.75	5.39
	3	6.1	2.68	3.18
	4	3.9	2.93	3.73
<i>B. cartei</i> fruit	0	1.0	-	-
	2	3.8	1.69	5.67
	3	6.9	2.82	4.42
	4	4.8	2.90	4.66

3차 년도에는 인간 면역세포의 생육 증가도를 뒷받침할 수 있는 자료로 면역 세포들이 분비하는 cytokine과 면역세포의 수를 측정하였고 결과는 Table. 17. 에 나타내었다.

우선 각 시료에 대한 cell density를 살펴보면 모든 시료에서 배양시간 의존적으로 세포농도가 증가하는 것을 보여주었으며 배양 4일째 가장 높은 세포 활

성도를 나타내었다. 그 중에서 유향 열매의 정유 성분이 배양 4일째 6.9×10^4 cells/ml로 가장 높은 활성을 나타내었고, 노간주 열매와 줄기의 정유 성분들은 각각 6.3×10^4 cells/ml과 6.1×10^4 cells/ml의 세포 활성을 나타내었다. 각 시료에 대한 세포 당 IL-6의 분비량을 살펴보면, 노간주 열매의 정유 성분이 배양 6일째 3.15×10^{-3} pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었고, 유향 열매와 노간주 줄기의 정유 성분은 각각 2.9×10^{-3} pg/cell와 2.93×10^{-3} pg/cell의 분비량을 나타내었다. 그리고 각 시료에 대한 세포 당 TNF- α 의 분비량을 살펴보면, IL-6와 다르게 배양 2일째 가장 많은 분비량을 나타내었으며, 그 양은 노간주 열매의 정유 성분이 5.89×10^{-3} pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었고, 노간주 줄기와 유향 열매의 정유 성분은 각각 5.39×10^{-3} pg/cell와 5.67×10^{-3} pg/cell의 분비량을 나타내었다.

이는 앞서 수행된 위의 항암 활성과 면역세포 생육 증진 활성에서 노간주 열매와 유향 열매의 정유 성분들이 높은 활성을 나타낸 것에 대한 중요한 뒷받침 자료로 사료되어지는 바이다.

바) 세포사멸 형태 측정

본 실험은 이전의 정상세포에 대한 독성과 암세포에 대한 성장 저해능 실험과 어느 정도 같은 맥락의 실험으로서 시료에 대한 세포 사멸의 원인을 규명하기 위해 형광염색법을 이용하여 관찰한 결과, 먼저 MCF-7 (Fig. 27)에 대해서는 전체적으로는 시료 투여 후 3일째까지 apoptosis가 증가하다가 다시 감소하면서 necrosis가 서서히 증가하는 것을 볼 수가 있었다. 여러 시료가 동일한 패턴을 보여주지만 그 중 분획물의 세포사멸이 다른 시료에 비해 세포사멸이 적게 일어나는 것을 확인하였다. 시료 투여 후 3일부터 necrosis가 증가하는 것은 MCF-7 세포의 형태학적 특성에 기인하는 것으로 사료되는데 이는 표면적이 다른 세포들에 비해 넓게 자라는 특징을 가지고 있어서 개체수 증가에 따른 생육공간의 제한이 세포사멸을 야기한 것으로 생각된다.

인간 유방암세포(MCF7)에 대한 실험에서는 시료 투여 후 3일째부터 급속한 사멸이 시작되는데 이는 시료의 세포에 대한 생육저해에 따른 것으로 보인다. 사멸 형태는 대부분이 apoptosis에 의한 것으로 시료의 세포에 대한 영향이 3일째부터 작용하는 것으로 보인다. 세포사멸비율은 70~80%으로 시료 투여 후 5일째는 부유 상태로 MCF7의 접착성세포임에도 거의 사멸한 것으로 생각된다. 각 시료별로 현저한 차이는 없었으나

분획물의 사멸비율이 80%로 다른 시료의 70%보다 높은 것으로 나타났다.

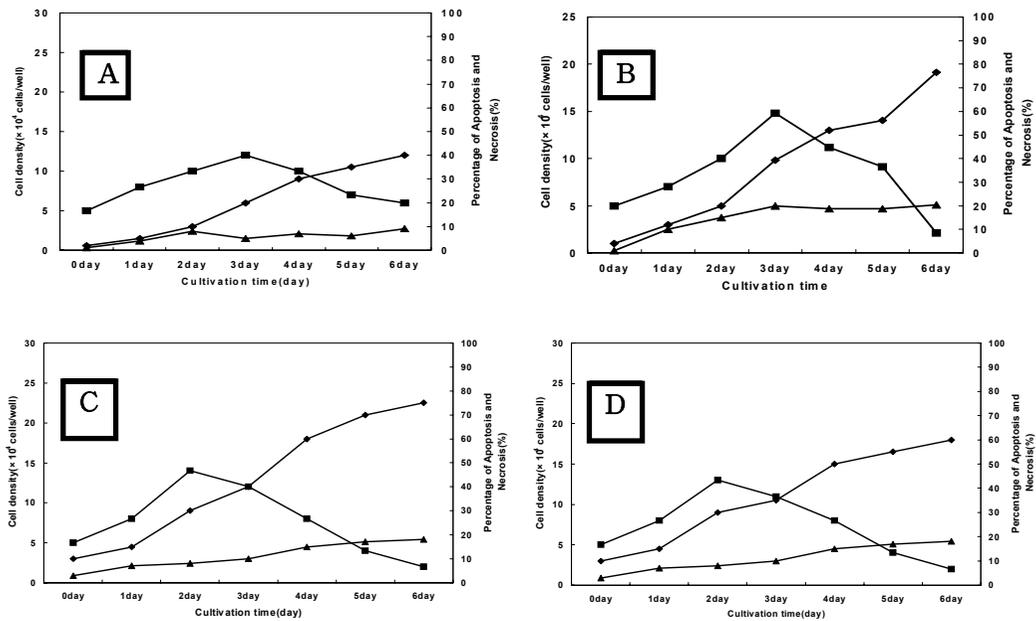


Fig. 39. The pattern of MCF7 cell growth (cell density : ■) and death (necrosis : ▲, apoptosis : ◆) in no adding (A) or adding *J. rigida* fruit (0.5g/L) (B), *J. rigida* trunk (C) and *B. cartei* fruit (D) according to the cultivation time.

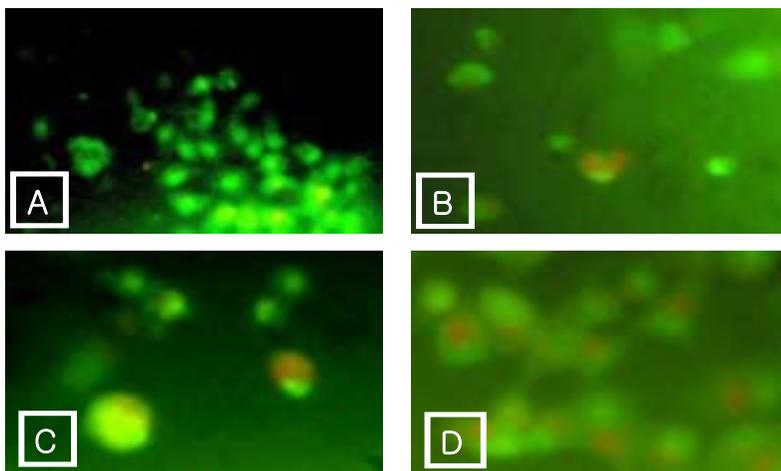


Fig. 40. Comparison of MCF7 cell growth and death in no adding (A) or adding *J. rigida* fruit (0.5g/L) (B), *J. rigida* trunk (C), *B. cartei* fruit (D) after 3 day of cultivation.

사) NK cell 활성화 측정

본 실험은 3차년도에 시행된 생리활성 실험으로 IL-2 비의존형 NK-92MI cell이 인간 면역 세포인 T cell을 이용하여, 이 세포들이 분비하는 IL-2를 비롯한 sample 투여로 인한 분비증가로 인해 NK cell의 활성도를 관찰한 것이다.

우선 T cell에 대한 NK cell의 활성을 살펴보면 배양 시간 의존적인 경향을 나타내었으며, 유향 열매의 정유성분이 배양 6일째 약 70%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이는 control 군과 비교하였을 경우 약 2.3배 정도 높은 활성이다. 노간주 열매와 줄기의 정유 성분은 각각 63.5%와 61.0%의 비교적 높은 활성을 나타내었다. 또한 NK cell의 viable cell density를 측정한 결과 유향 열매의 정유성분이 15×10^2 cell/ml의 활성을 나타내었으며, 이는 control 군의 6.3×10^2 cell/ml과 비교하였을 경우 약 2배가 넘는 수치이다. 노간주 열매와 줄기의 정유 성분은 각각 10×10^2 cell/ml와 9.4×10^2 cell/ml의 활성을 나타내었다.

이러한 결과들은 각각의 정유 성분들을 T cell에 투여하였을 경우 T cell의 IL-2를 비롯한 유용활성 성분이 촉진되는 것으로 사료되어지는 바이다.

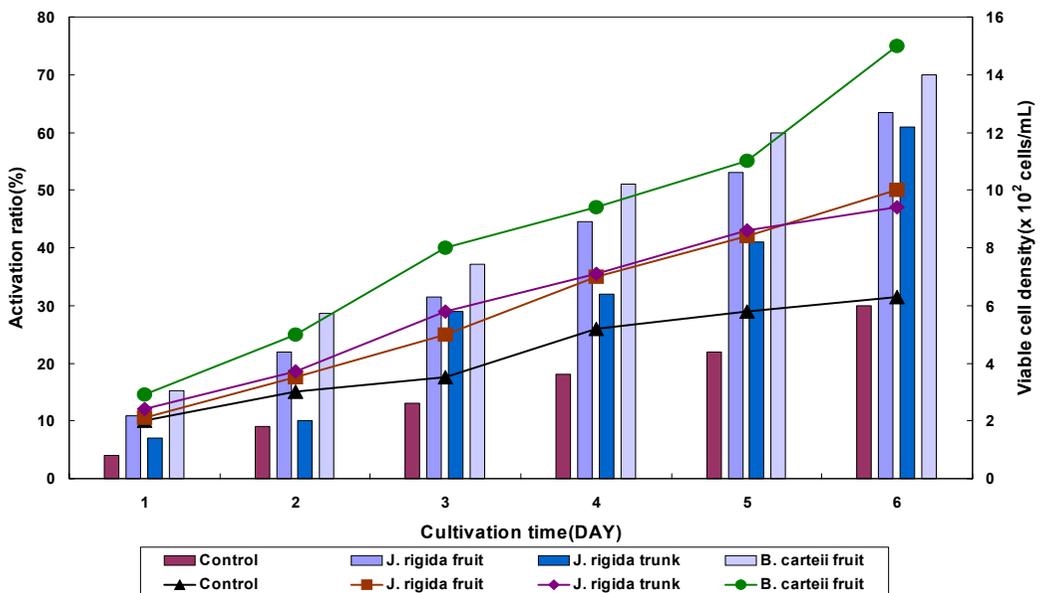


Fig. 41. The NK cell activity and growth of viable cell density of human T(Jurkat) cell in no adding or adding the samples.

아) 세포 분화능

본 실험에 사용된 세포는 human promyelocytes(HL-60)인 전골수세포로서 macrophage나 granulocyte로 분화가 되어 사멸하는 기작을 가지고 있다. 세포 분화는 수정란으로부터 유래된 미분화 세포가 특정 형질을 갖는 세포들로 변화되어 가는 과정이며, 이러한 과정은 여러 신호 전달 체계와 유전자의 형질 발현의 조절에 기인하다. 이러한 세포 분화로 인하여 세포와 세포간의 신호전달 체계에 영향을 미쳐 세포의 구조와 기능을 결정짓게 되는 것이다. 이러한 분화 촉진으로 인하여 여러 가지 세포로의 분화를 촉진하게 될 것으로 사료되어지고, 그 중 면역 세포에도 그 효과가 있을 것으로 생각되어지는 바이다.

항암 및 면역기능의 역할에 대한 분자수준에서의 검증을 위해 HL-60 세포의 분화도를 살펴본 결과를 Fig. 42.에 나타내었다. HL-60 세포에 각 시료를 1.0 g/L의 농도로 투여한 후, 배양 2, 4, 6일째 HL-60 세포의 분화도를 측정한 결과이다. 모든 시료들이 배양 시간이 늘어나면서 HL-60 세포의 분화도가 증가하는 것으로 나타났다. 모든 정유 성분들의 HL-60 세포의 분화도는 모두 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 유향 열매의 정유 성분이 control 군에 비하여 1.38 배의 증진 활성을 나타내어 가장 높은 분화도를 나타내었으며, 노간주 열매와 줄기의 정유 성분은 각각 1.37배와 1.32배의 활성을 나타내었다. 이는 각 시료들이 세포의 분화나 사멸기작에 직접적으로 작용하기보다는 면역체계에서 점진적으로 작용하는 것으로 추측할 수 있다.

Fig. 43.은 각 시료를 첨가한 후, 배양 4일째 되는 날 촬영한 것으로, HL-60 세포의 상당수가 둥근 모양의 macrophage로 분화된 것을 관찰할 수 있었다.

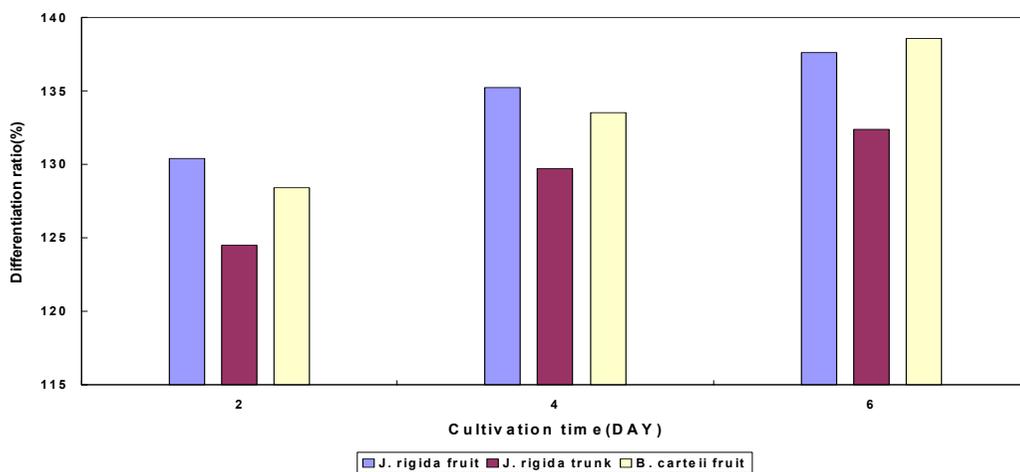
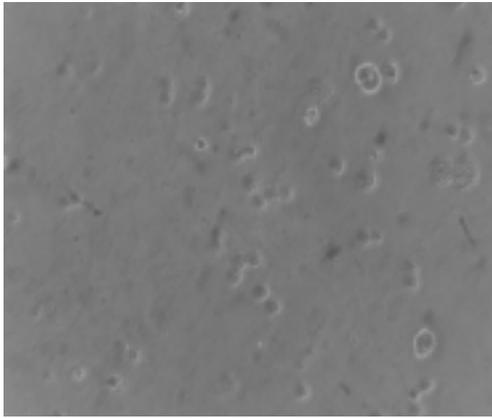
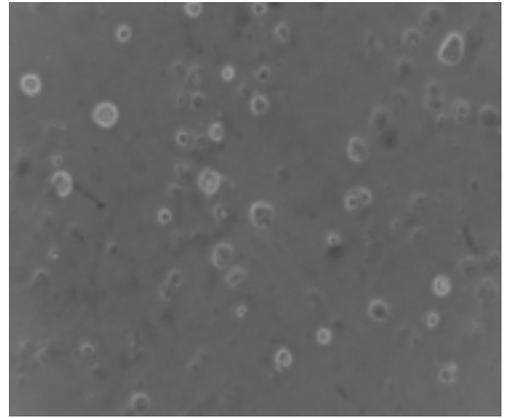


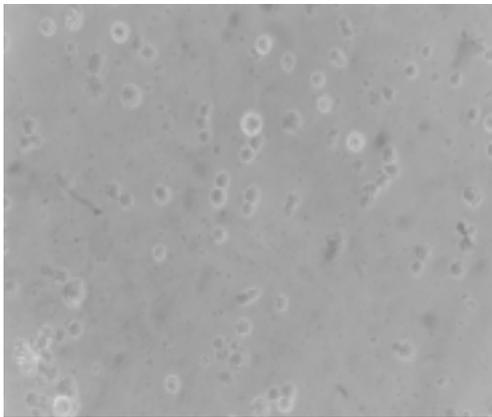
Fig. 42. Differentiation of HL-60 cells after treatment with samples.



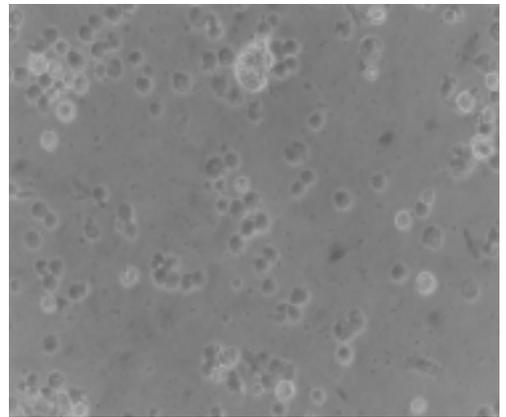
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 43. Comparison of normal cells(A) and differentiated cells by essential oil from *J. rigida* fruit(B), *J. rigida* trunk(C), *B. carterii* fruit(D) after 4 day of cultivation.

자) Mice를 이용한 *in vivo* 항암 활성

최종 3차년도에는 모든 *in vitro* 실험의 증명을 위하여 mice에 종양세포(S-180)를 접종하여 나타난 실험의 결과를 다음 그림과 표에 나타내었다.

우선 Fig. 44.은 mice에 복수암을 유발시키지 않은 standard control 군과 복수암을 유발시킨 control군과 실험군의 쥐의 무게를 비교하여 나타낸 것이다. 그 결과를 살펴보면, 종양세포(S-180)를 접종한 후, standard control 군을 제외한 control 군과 실험군에서 8~12일 사이에 쥐의 무게가 급증하였다. 이는 접

중한 종양세포에 의해 쥐들이 복수암이 유발되는 것을 의미하는 것이다. 외형 상으로도 쥐의 복부가 팽창하는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 45와 Table. 18은 쥐의 생존일수와 생존율(survival rate)을 나타낸 것이다. 가장 높은 생존율을 나타낸 군은 종양투여 후 44일간 생존한 노간주 열매의 정유 성분을 처리한 군이고, 노간주 줄기의 정유 성분과 유향 열매의 정유 성분을 처리한 실험군은 각각 최대 36일과 40일간 생존하였다. 생존율을 살펴보면 노간주 열매의 정유 성분이 142.6%로 가장 높은 생존율을 나타내었다. 그리고 노간주 줄기의 정유 성분과 유향 열매의 정유 성분을 처리한 실험군은 각각 118.5%와 131.5%의 생존율을 나타내었다.

Fig. 46은 복수암을 접종한 후, 20일째 되는 날 쥐들의 외형을 관찰한 사진이다. 사진에서 보는 바와 같이 종양세포를 접종하지 않은 standard control group(A)을 제외하고는 모든 실험군이 복수암이 유발되어 복부가 팽창하는 것(B~E)을 관찰할 수 있었다.

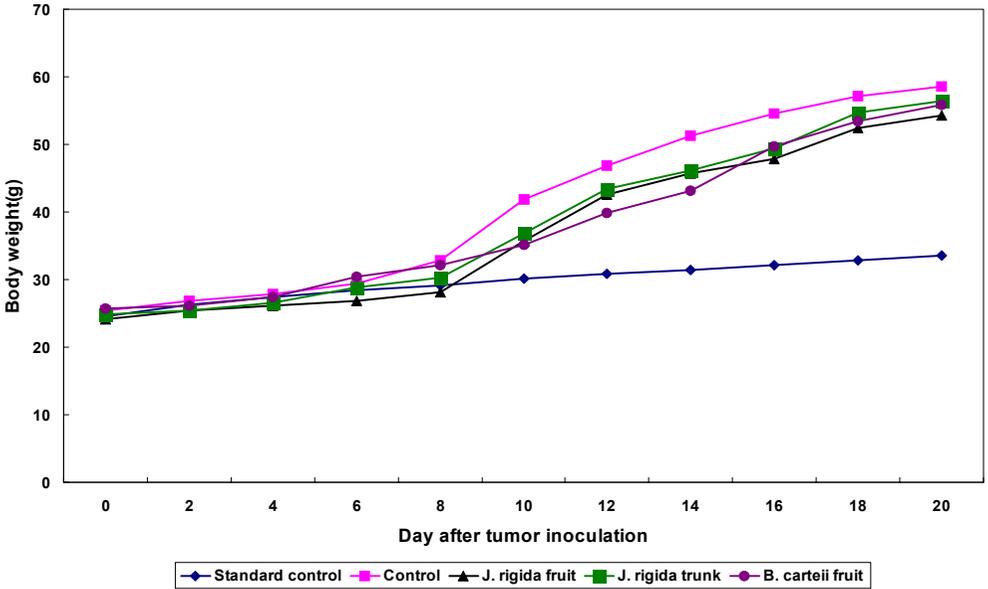


Fig. 44. Increase of body weight and effect of samples on the growth of ascites from Sarcoma-180 cell in tumor-induced and normal ICR mice.

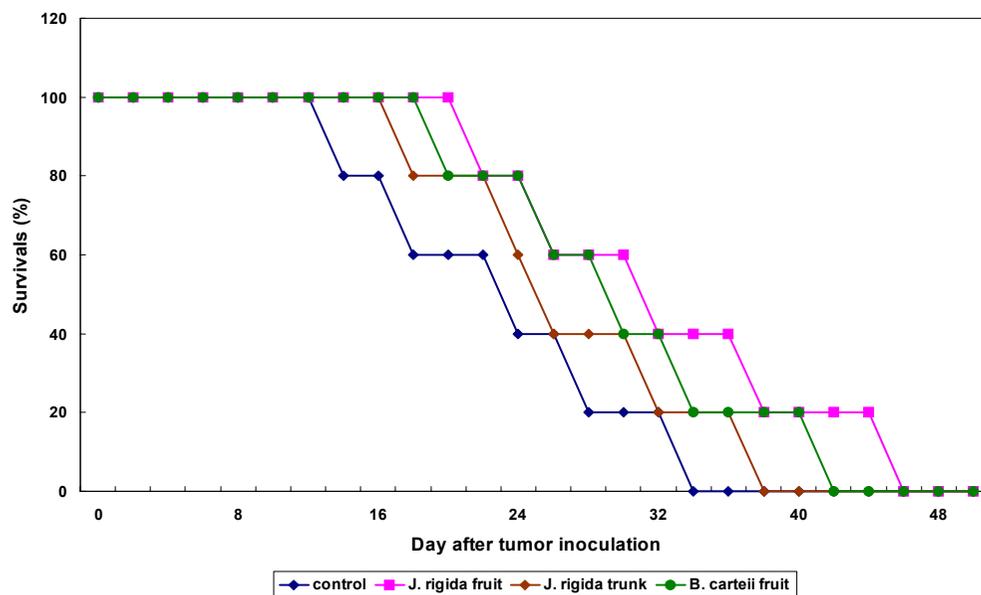


Fig. 45. Effect of intraperitoneal administration of samples on the growth of Sarcoma-180 inoculated intraperitoneally.

Table. 18. Survival rate of samples on the growth of ascites from Sarcoma-180 in ICR mice.

Sample	Survival rate (%)
<i>J. rigida</i> fruit	142.6
<i>J. rigida</i> trunk	118.5
<i>B. cartei</i> fruit	131.5

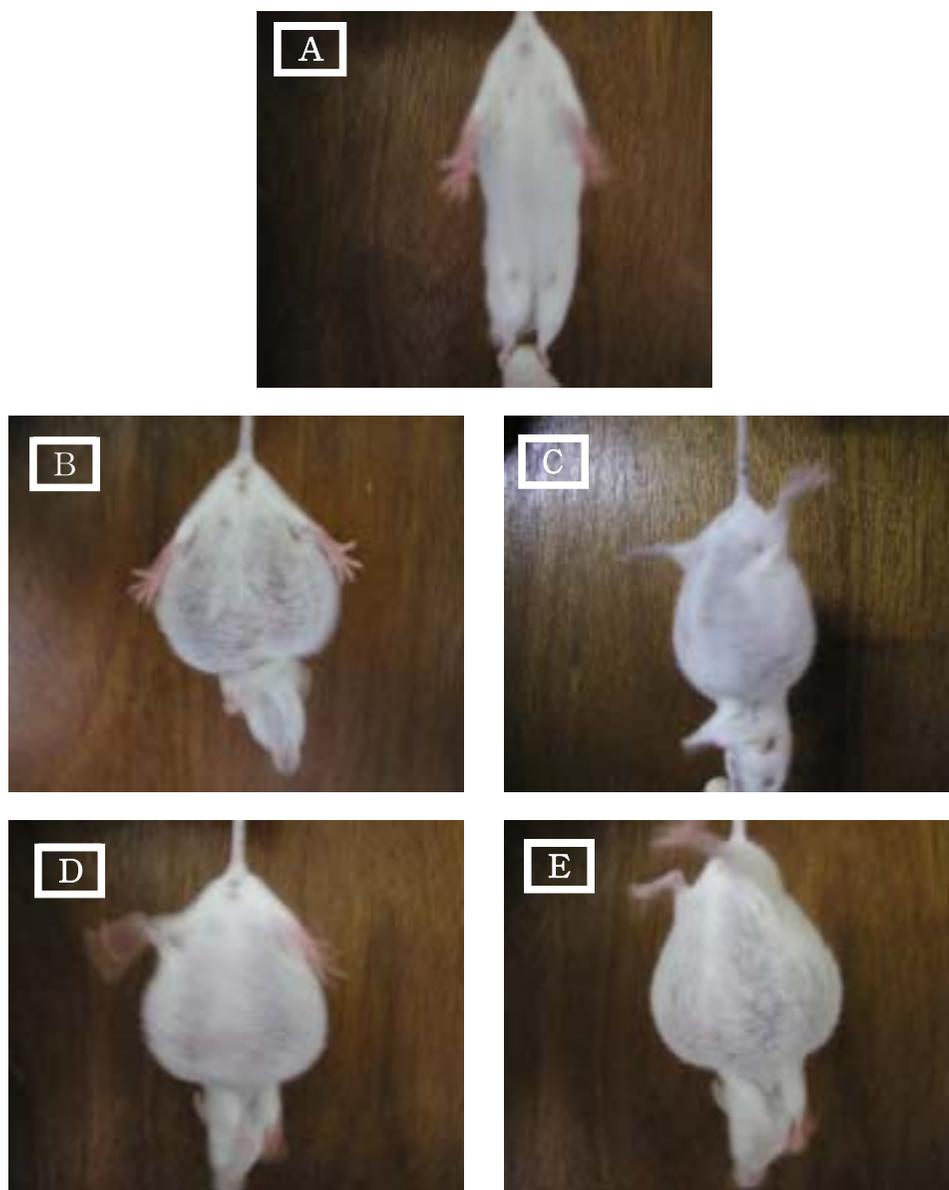


Fig. 46. The features of mice to inoculated after 20 days(A : standard control group, B : control group, C : treated essential oil from *J. rigida* fruit group, D : treated essential oil from *J. rigida* trunk group, E : treated essential oil from *B. cartei* fruit group).

제 4 장 요약

본 연구는 국내산 관목식물자원을 활용하여 고수율의 정유물질 생산과 공정개발 그리고 이를 이용한 기능성 제품 및 생물의약품 소재와 같은 새로운 제품 개발이라는 주목표를 달성하기 위해 3년 동안 연차별 연구를 추진한 결과를 토대로 여러 대상 수목의 초임계 추출물에 대한 생리활성 실험결과 중 **노간주나무와 유향**으로부터 분리한 정유성분이 활성이 우수하다는 것을 알 수 있었고, 3년 동안 수행된 연구결과를 다음과 같이 요약 할 수 있었다.

1. 각 수목에 대한 추출 수율은 대상수목과 추출 방법 및 부위에 따라 현저한 차이를 나타내었는데 특히 회향과 유향은 SFE 추출 수율(4.0, 3.5 %(v/w))이 기존의 SDE 추출법에 의한 추출 수율 (2.4, 3.1 %(v/w)) 보다 현저히 높은 추출 수율을 나타내었고, 노간주나무와 화살나무는 SDE 추출 수율 (3.2, 2.9 %(v/w)) 이 SFE 추출 수율 (2.4, 1.9 %(v/w))보다 높게 나타내었다.

2. 각 수목에 대한 정유성분의 제품화를 위해 oil들의 조성을 GC/MS로 검토한 결과 대체적으로 SDE 추출법보다 SFE 추출법을 통해 얻어낸 정유에 유용성분이 더 많이 포함되었다.

3. 각 정유성분의 가공적성 평가를 위한 panel test와 Masking 분석 결과 유향과 노간주 나무의 정유 추출물이 맛과 향이 뛰어나 향후 제품개발에 대한 가능성을 제시하였고, 최종 시제품의 대상 작목으로 선정하였으며, 효율적인 추출장치의 기기 구입 및 정유 활용에 대한 경제성 평가를 실시하였고, 그 결과 기기를 직접 구입하는 경우보다는 임차하여 사용하는 것이 경제적으로 유리하다는 것을 알 수 있었다.

4. 각 수목에 대한 정유 추출물은 폐암세포, 위암세포, 유방암세포, 간암세포에 대한 생장 억제능 평가에서 50~84%의 높은 억제능을 보였다.

5. 각 정유 추출물의 돌연변이 억제능 평가에서도 유향의 정유 성분은 45%로 다른 시료들에 비해 보다 높은 억제능을 나타내었다.

6. 각 정유 성분들의 간기능 증진에 대한 실험 결과, 전체적으로 간기능 증진의 활성이 높게 나타났으며, 특히 화살나무가 최고 농도(1.0 g/L)에서 약 1.7배로 다른 시료들보다 높은 활성을 나타내었고, 유향, 회향, 노간주도 1.1배 이상의 활성을 나타내었다.

7. 각 정유 성분들의 신경세포 활성 측정에서는 무첨가군에 비해 60~70%이상으로 높

은 활성을 나타내었다.

8. 각 정유 성분들의 면역 증진 검색 결과, 전체적으로 면역활성을 증가시키는 것으로 나타났고, 특히 유향 열매의 정유 추출물이 1.0g/L의 농도에서 가장 좋은 활성을 나타냈으며, T 세포의 각 cell 당 TNF- α 의 분비량은 배양 2일째 최대 분비량을 나타냈고, IL-6의 경우에는 모든 시료들이 농도 의존적 증가하는 경향을 나타내었다.

9. 각 정유성분들의 Apoptosis 측정결과 시료 투입후 3일째부터 급속한 사멸이 시작되었고, 세포 사멸 비율은 70~80%로 나타났으며 형광염색법을 이용하여 확인하였다.

10. 각 정유성분들의 NK cell의 활성도를 관찰한 결과 유향 열매가 약 70%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 노간주 열매와 줄기의 정유 성분도 각각 63.5%, 61.0%의 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이 결과들은 각각의 정유 성분들을 면역세포에 투여 하였을 때 NK cell의 활성을 증진시켜 면역활성을 증진시키는 것으로도 사료되었다.

11. 항암 및 면역기능의 역할에 대한 분자수준에서의 검증을 위해 HL-60 세포의 분화도를 살펴본 결과, 배양시간 의존적으로 분화도가 증가하는 경향이 나타났으며, 특히 유향 열매의 정유성분이 control 군에 비하여 1.38배의 증진 활성을 나타내어 분화도가 가장 높게 나타났다.

12. 모든 in vitro 실험을 증명하기 위해 mice를 이용한 항암 활성을 관찰한 결과 노간주 열매의 정유 성분이 약 143%로 가장 높은 생존율을 나타내었고, 다른 정유 성분들도 110% 이상의 생존율을 나타내었다.

연구 결과를 바탕으로 대상관목 중 제품화가 가능한 정유 성분을 선별하여 고수율 획득이 가능한 공정을 이용해 음료, 다류, 환, oil 제품 등을 생산하기 위한 기능성 식품 제조를 위한 제품화 공정 확립하여 각 개별 단위 공정들의 연결 및 총체적 system 확립하였다. 이를 바탕으로 결정 공정에 따른 시제품을 생산하였고, 유용 활성이 높은 수목자원의 대량 식재 지역 선정하여 임업 농가 계약 재배 및 방법 지도를 통해 농가 소득 증대에도 기여하였으며, 개발 공정 및 시제품들의 marketing 분석 및 기타 경제적 타당성 연구 검토를 통해 농가의 관목 재배 기술지도 및 계약 재배를 위한 방안을 구축하고자 하였고, 연구 결과를 토대로 **학회 논문 발표(2건)**, **SCI 논문(1건)**, **특허 출원 등록**을 완료하였다. 또한 이 같은 연구 결과를 바탕으로 정유 추출기술의 상용화를 위한 시설 및 운영비 계산 등과 같은 경제성 분석을 통해 최종 산업화를 위한 model을 확정할 수 있었다.

제 5 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

본 연구는 국내산 관목식물자원을 활용하여 고수율의 정유물질 생산과 공정 개발 그리고 이를 이용한 기능성 제품 및 생물의약품 소재와 같은 새로운 제품을 개발이 주 목표이다. 이를 위해 3년 동안 연차별 연구를 추진하여 당초 연구 개발 최종 목표 달성은 이루어진 것으로 평가된다.

이와 함께 각 단계별 연구 목표 및 달성 정도에 관한 결과는 다음과 같다

1차년도 연구에서는 주요 대상 관목류인 노간주나무, 회향나무, 딱총나무, 참빗살나무, 유향나무 등 국내 자생관목에 존재하는 정유 성분 추출 및 수율 증진을 위해 초임계 및 다단계 추출기술로 고수율의 정유 추출 기술을 확립하고, 다양한 수목 자원들의 부위별 (목질, 외피, 내피, 열매, 잎, 뿌리 등) 수율 증진이 가능한 추출 공정 개발을 확립하였다. 또한 국내 수목 자원 및 정유 활성 성분들의 Data-base화를 위해 국내에서 자생하며 대량 채취가 가능한 수목자원의 선별 및 배양 기초 기술을 확립하였으며, 대상 정유류들의 제품화 적성(성능) 실험을 통해 대상 수목들 내 존재하는 제품화가 가능한 정유류의 생리 활성 성분을 검색하여 이를 기초로 활성 성분들의 고농도 농축, 추출 및 가공이 용이한 공정 적성 실험을 실시하여 정유 성분들의 생리 활성 탐색 및 검증을 위한 활성 기능의 *in vitro*, *in vivo* 검증 및 제품화 기초를 확립하였으며, 상기의 연구를 바탕으로 2차년도, 3차년도에 집중적 연구 개발을 위한 정유 물질의 유용성(생리활성 검증), 고수율 및 제품화 가능성을 가진 관목 및 정유를 결정하였다.

2차년도 연구에서는 대상 공정별 가공 특성 확립 및 활성성분 활용화를 위해 분리, 농축, 포집, 초임계 추출공정 등 다양한 공정 실험이 진행되었고, 결정 공정들을 이용한 정유 제품화를 위한 공정 scale-up 실험 및 이에 따른 공정 변수들의 최적화 실험을 통해 정유의 대량 추출 기술을 확립하였다. 또한 노간주의 3종의 유용 활성 성분의 독성 실험, *in vitro*, *in vivo* 실험을 보다 체계적으로 진행하여 제품화 가능성 검증을 완료하였으며, 유용 정유의 제품군을 확정하였으며, 상용화 기초를 마련하였다. 또한 본 과제와 관련해 학회논문(1건) 과 특허 출원(1건) 등록을 완료하였다.

3차년도 연구에서는 최종 결정된 정유를 이용한 기능성 식품 개발을 위한 제품화 공정이 결정되었고, 음료, 다류, 환, oil 제품 등을 생산하기 위한 각 개별 단위 공정들의

연결 및 총체적 system 확립되었으며, 결정 공정에 따른 다양한 형태의 시제품 생산을 완성하였고, 개발 공정 및 시제품들을 marketing 분석 및 기타 경제적 타당성 연구 검토를 완료하였으며, 본 과제와 관련해 학회논문(1건)과 SCI 논문(1건)을 발표하였다.

최종적으로 3년 동안 단계적 연구를 통해 여러 대상 관목들중 노간주나무 줄기/열매, 유향나무 열매로 유효 수목의 범위를 줄일 수 있었고 이를 이용한 정유성분의 추출 및 수율 증진을 위한 복합 다단계 초임계 추출 공정을 산업화시킴으로서 기존의 방식과 비교해 고효율을 창출할 수 있는 공정 system이 확립되었으며, 대상 정유성분들의 *in vitro*, *in vivo* 관련 생리활성 검증 및 가공적성 평가를 통해 관목 자원으로부터 새로운 유용활성들을 가진 정유들을 이용한 새로운 건강기능성식품 및 생물 의약품 또는 소재화 기술 개발을 이루어 기존의 제품들과 같이 향유를 이용한 단순한 방향 관련 제품이 아닌 고부가가치를 창출 할 수 있는 새로운 형태의 제품을 개발하여 판매할 수 있는 기반을 마련할 수 있었다.

제 6 장 연구 개발 결과의 활용 계획

이 기술이 상용화되면 국내의 특용 작물 및 기타 임산물들의 가공 기술에 일대 변혁이 예상되며, 수목자원이 새로운 소득 작목으로 부상해 지금까지의 단순 가공을 넘어 진정한 의미의 기능성 식품 또는 식품 소재의 개발에 시초가 될 것이다. 본 연구의 성공은 기존의 임산물을 이용한 기능성 식품 개발로부터 얻을 수 있는 경제적 과급효과의 수십 배에 달하는 결과를 얻을 수 있을 것이다. 특히 이 같은 제품 및 기술 개발은 다른 식품 공정 개발들에 비해 그 성공 가능성이 매우 높으며, 공정 개발이 곧 산업화와 직결되는 장점을 갖고 있다.

또한 본 연구 결과물인 시제품들을 marketing 조사 결과 지금 현재 소비자들이 요구하는 새로운 형태의 기능성 제품 수요에 부응하는 것으로 성공 가능성이 매우 높다. 현재 시판중인 제품에 기능성을 부여하여 새로운 형태로 개발, 시판하고자 한다

제 7 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

초임계액추출법, 핵심적인 건강식품 제조기술로 부상중

건강에 관심이 많은 미국인들을 위해 보다 영양이 풍부한 식품을 생산할 수 있는 길이 초임계 액추출법(SFE : supercritical fluid extraction)이라고 하는 환경적으로 안전한 가공법을 미 농무부 농업연구소(ARS) 과학자들이 닦아놓는 것 같다.

수십 년간 SFE를 사용해온 일리노이주 페오리아(Peoria)의 국립농업이용연구센터(NCAUR=National Center for Agricultural Utilization Research) 연구자들은 커피에서 카페인을 제거하고 맥주 향 용도로 호프를 추출하는 정도에서 벗어나 응용범위를 확대했다. 이들은 미강, 옥수수 섬유 혹은 옥수수 기울, 콩 등에서 뉴트라세티칼(neutraceuticals)라고 부르는 영양적으로 유익한 화합물을 추출해서 높이는 수단으로 사용했다. 대체 뉴트라세티칼 공급원을 제공하고 기름종자와 제분산업의 부산물에서 부가가치를 찾는 것이 목표이다.

식물 추출 기름에는 최근 인간의 건강을 증대시키는 것으로 나타난 뉴트라세티칼이 함유되어 있다. 예를 들어 미강, 콩, 옥수수 섬유 기름 모두 상당 수준의 파이토스테롤(phytosterol)이 함유되어 있다는 것이 ARS NCAUR 화학자 Jerry W. King의 설명이다. 콜레스테롤을 강하하는 성질이 있는 것으로 예상되는 파이토스테롤은 상업적으로 판매되고 있는 마가린과 빵에 발라먹는 잼 등에서도 볼 수 있다.

SFE는 그런 화합물을 추출할 수 있는 환경 친화적이면서 소비자에게 안전한 방법이다. 반액체화된 이산화탄소를 이용하기 때문이다. 이전에 고기에서 지방을 제거하거나 실험실에서 유기용매 대신 SFE를 사용할 수 있다는 기사가 나간 적이 있었다(Agricultural Research, "Supercritical Fluid Fat Extraction," 3월호 1995, p. 18, and "Cutting Use of Laboratory Solvents," 3 호 1993, p. 12.)

NCAUR에 있는 King과 Scott L. Taylor는 채소유에서 목표 뉴트라세티칼을 추출하여 높이기 위해서 이 안전한 방법을 일반적으로 안전하다고 여겨진 에탄올 같은 용매와 물 추출법과 결합시켰다. 천연의 식품-소비 가능한 용매를 사용해서 그들은 페룰레이트-파이토 스테롤(ferulate-phytosterol) 14.5%를 함유한 추출물을 생산해내었는데 이 물질은 인간에서 콜레스테롤을 낮추는 효과가 있는 것으로 다른 ARS 연구자들이 알아내었다.

더욱 최근의 SFE 관련 프로젝트에서 Taylor는 콩 기름에서 인지질을 생산했다. 그는 공정 단계에서 일어나는 두 단계 즉, 추출과 크로마토그래피를 결합시켰는데 용매로서 이산화탄소, 에탄올, 물만을 썼다. 이 세 가지는 콩기름과 음식물에 쓸 수 있는 유일한 가공제들이다.

분리한 인지질 농축액은 인지 기능 개선과 같은 건강 유익을 제공하는 것으로 알려져 있다.

이전 연구조교 Nurhan T. Dunford는 초임계액체기술을 추출 바로 전단계에서 사용했다. 공학기술자 Jeff Teel의 도움으로 그녀는 분획화 컬럼을 제작했는데 정유산업에서 쓰는 증류 장치와 비슷하다. 이 장치는 화학추출 용매를 쓰지 않고 원하는 뉴트라세티칼 성분을 얻어내어 높일 수 있다. 이 연속적 시스템은 초임계액체분획화(SFF = supercritical fluid fractionation)로 부르며 이 장치로 정제되지 않은 채소유에서 파이토스테롤-강화 분획을 얻을 수 있다.

현재 비싸고 복잡한 공정을 거쳐서 기름에서 뉴트라세티칼을 추출하여 제품에 첨가하는 방식을 쓰고 있기 때문에 SFF는 산업적으로 이용이 가능하다는 것이 Dunford의 설명이다. 그녀는 현재 오리자놀(oryzanol)을 추출하기 위해서 미강 기름을 조사중인데 오리자놀은 인간의 콜레스테롤 수준을 낮추는 것으로 알려져 있다.

King과 협력 연구를 하고 있는 또 다른 NCAUR 과학자 Gary List는 이산화탄소가 있는 상태에서의 수소화 반응을 이용하여 트랜스 지방산 함량이 낮은 산물을 생산하여 마가린 제형에 쓸 수 있는 가능성을 보였다.

Jerry W. King, Scott L. Taylor

USDA-ARS New Crops and Processing Research Unit, National Center for Agricultural

Utilization Research, 1815 N. University St., Peoria, IL 61604;

전화: (309) 681-6203 (King), (309) 681-6204 (Taylor), 팩스: (309) 681-6686.

2. 초임계 이산화 탄소 및 에탄올 이용한 추출법 개발

본 논문의 연구자들은 음식 생산물로부터 허용 가능한 용매인 에탄올과 이산화탄소를 이용한 초임계 추출기술을 통해, 고압 기기 내부에서 코코아 콩으로부터 코코아 버터, 테오브로민 (theobromine), 그리고 메틸산틴 (methylxanthines)의 회수에 대한 연구를 수행했다.

연구자들은 코코아 콩들의 연속적인 추출을 20 및 40 Mpa의 압력과 343.2K의 온도에서 이산화탄소를 이용해 수행했으며, 에탄은 15.2, 24.8, 28.3 Mpa 의 압력에서 수행했다. 에탄을 통해 얻어진 코코아 버터의 추출 수율은 이산화탄소를 통해 얻어진 것보다 상당히 많은 양이었는데, 그 이유는 에탄에서 이러한 지방물질의 더 높은 용해도 때문이었다.

메틸산틴 (methylxanthines)과 코코아 버터의 추출에 대한 압력의 뚜렷한 효과가 두 용매의 경우 관찰됐다. 추출곡선들은 카페인과 테오브로민 (theobromine)에 의해 뒤따라오는 코코아 버터를 추출하는데 있어서 이러한 용매들의 더 좋은 특성을 나타냈다. 이러한 거동은 코코아 콩으로부터 코코아 버터, 카페인, 테오브로민 (theobromine)의 추출 및 격리 아래에서 가능한 조건범위들을 제안하고 있다.

코코아 콩에서의 메틸산틴 (methylxanthines)들은 이산화탄소보다 에탄에서 약간 좀더 잘 녹는데 그 이유는 아마도 초임계 에탄을 이용해 좀더 쉽게 추출한 코코아 버터의 동시적인 용해 특성효과 때문일 것이다.

에탄의 더 높은 비용에도 불구하고, 에탄의 임계압력은 이산화탄소보다 더 낮으며, 버터의 더 높은 용해도는 낮은 에너지 비용을 통해 에탄을 좀더 효율적인 용매로 만들 수 있다.

정보출처 (Ind. Eng. Chem. Res., 41 (26), 6751 -6758, 2002.)

발행일 20021215

발행국가 BRAZIL

원문언어 English

등록일 2002/12/24

3. 수목의 정유성분 "cedrol"의 수면개선효과

일본 가오우 주식회사의 헬스케어연구소가 도야마의과약과대학, 국립정신신경센터와의 공동연구 결과, 편백나무와 삼나무 등의 수목으로부터 고순도(99.85% 이상)로 정제한 수목정유성분 "cedrol"의 향기가 심신을 이완시키는 신경계인 부교감신경계를 양호한 상태로 하여 진정작용을 나타낸다는 사실을 밝혀냈다.

이러한 진정효과가 높은 향기가 수면의 질을 향상시킬 수 있을 것으로 보고, 연구팀은 불면증을 호소하는 여성에 대해 cedrol의 향기에 의한 수면개선효과를 검증했다.

연구팀은 불면증을 호소하는 여성 30명에 대해 수면실험실(11명, 평균연령 24.5세, 수면 뇌파로부터 수면판정) 및 자택(19명, 평균연령 24.0세, 활동량계로 수면판정)에서의 수면실험을 실시했다. Cedrol을 가열법(섭씨 120도, 취침 전 2시간, 취침 후 2시간의 합 4시간)에 의해 실내로 휘산시켜 cedrol을 사용하지 않은 밤(플라시보 밤)과의 수면상태를 비교했다.

그 결과 수면실험실에서는 cedrol을 사용한 밤은 플라시보 밤보다 총 수면량이 증가했고 취침 후 수면에 들어가기까지의 시간이 단축되어 수면효율이 높아졌다. 또한 자택에서의 실험결과 cedrol을 사용한 밤은 플라시보 밤보다 수면 전반에 있어서의 연속 5분 이상의 명료한 중도각성의 감소가 인정되어 수면효율이 높아졌다.

Cedrol은 수면의 질을 향상시키는 효과뿐만 아니라, 연속사용에 의한 효과감소도 없으며 미향성이라 개인의 향기 취향에도 잘 맞을 것으로 예상된다. 이번 연구결과는 제16회 유럽수면학회와 미국수면학회에서 발표된다.

가오우는 이번 연구결과를 바탕으로 "sleep care"를 테마로 숙면관련상품을 개발해나갈 방침이다.

정보출처 (http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=24494)
발행일 20020531
발행국가 JAPAN
원문언어 Japanese
등록일 2002/05/31

제 8 장 참고문헌

1. L. logan (ed). Herbs for Health, pp.101-121 , Companion Press, Long Island (1999).
2. E. Putievsky, and U. Ravid. *Conservation of Genetic Resources of Aromatic and Medicinal Plants*, pp. 43-50, International Symposium in Oeiras VI, Portugal (1984).
3. J. Pino, J. Garcia and M. Marinez. *Comparative chemical composition of the volatiles of Goleus aroma produced by steam distillation, solvent extraction*. J. essent. Oil Res., 8, 373-375 (1996).
4. P.A. Gorin and M. Iacomini. *Polysaccharides of the lichens Ramalina usnea*. Carbohydrate Res., 128, 119-132 (1984).
5. E.S. Olafsdottier. *Immunologically active glucans from Cetraria islandica*. Phytomed., 6, 33-39 (1999).
6. P.Altman. *Australian tea tree oil-a natural antiseptic*. Aust.J.Biotechnol., 3. 217-248 (1989).
7. I. B. Bassett, D. I. Pannowitz and R. S. Barnetson, *A comparative study of tea tree oil versus benzoyl peroxide in the treatment of acne Med. J. Australia*, 153, 455-458 (1990).
8. C. Beer. *Australian tea tree oil*. Nature Health, 6, 3-7 (1987).
9. A. R. Penfole, *some notes on the essential oil of M. alternifolia*. Aust. J. Pharm., 30, 274-248 (1937).
10. C. Beer. *Australian tea tree oil*. Nature Health, 7, 16-17 (1986).
11. E. Teushcer, M. Melzig, E. Villmann and K. U.Moritz. *The effect of the oils on mouse central nerve system*. Zeitschr. Phytotherapie, 11, 87-90 (1990).
12. P. Seeman, *Pharmacological strategies in CNS trauma*. Pharmacol.Rev., 24, 582-588 (1972).
13. K. A. Colby and M. P. Blaustein. *Development of sensory-motor synapses in the spinal cord of the frog*. Neuroscience, 8, 4685 (1988).
14. W. D. Willis and R.E. Cogeshall, *Sensory mechanisms of the spiral cord*, J. Comp. Neurol., 310, 285-299.
15. W. W. Fantle, D. E. Johnson and L.T. Wikkianm, *The invasion of NGF in rat nerve cells*. Ann. Rev. Biochem., 62, 453-481 (1993).
16. D. R. Kaplan, K. Matimoto, E. LUCarelli and C. J. Thiele, *Induction of trkBb by retinoic acid mediates biologic responsiveness to differentiation of human neuroblastoma cells*. Neuron., 11, 321-331 (1993)

17. M. Schorderet, *Alzheimer's disease: fundamental and therapeutic aspects*. *Experientia*, 51, 99-105 (1995).
18. B. K. Hwang and P.K. Chung, *Encyclopedia of chinese medicinal plants*. pp. 3504-3507, National San. Press. Peking (1988).
19. H. Joon, *Clinical applications of oriental medicine*. pp. 104-119, Korea press, Seoul (1981).
20. J. A.Pino, J.Garcia and M.A.Martinez, *Solvent extraction and supercritical carbon dioxide extraction of Pimenta dioica Merrill. Leaf*. *J. Essent. Oil Res.*, 9, 698-691 (1997).
21. E. Stahl and D. Gerard, *The application of supercritical fluid extraction*. *Perfum. Flavor*, 10, 29-33 (1985).
22. J. A. Pino, J. Garcia and M. A. Marinez, *Comparison between the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of Ocimum gratissimum L.* *J. Essent. Oil Res.*, 10, 575-577 (1998).
23. K. Kerrola, *Isolation of essential oils and flavor compounds by dense CO₂*. *J. Food Rev. Int.*, 1, 547-573 (1995).
24. J. P. Whish, *A flexible distillation system for the isolation of essential oils*. *J. Essent. Oil Res.*, 8, 405-410 (1996).
25. G.R. Cunha, R.M. Bigsby, P.S. Cooke and Y. Sungimura, *Stromaepithelial Interactions in adult organs*. *Cell. Diff.*, 17, 137-148 (1990).
26. H. G. Wada, J. C. Owichi, L.H. Brunner, K.R. Miller and J.W. Parce. *Measurement of cellular responses to toxic agents using a silicon microphysiometer*. *Alternatives Animal Test. Experimentation*, 1, 154-164 (1992).
27. W. C. Scheffler, *Statistics: Concepts and applications*, pp 389, Benjamin and Cuning Pub., LA (1985).
28. A. I. Faden and S. Saljman, *Pharmacological strategies in CNS trauma*. *Trends Pjarma.*, 13, 29-35 (1992).
29. W. Jennings and T. Shibamoto, *Quantitative analysis of flavor and fragrance volatiles by capillary chromatography*. Academic Press., New York (1980).
30. 주요 약용 식물 재배 기술. 농진회. (1993).
31. 한국차 생활 총서. 강승희, 서울 출판사. (1996).
32. 한국차 문화. 정영선, 도서출판 너럭 바위. (1991).
33. 한국 식경 대전. 이성우, 향문사. (1992).
34. Bajpai, S.M. and A. Margaritis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31:305. (1979).

35. Norman, B.E. and B. Pederson. *Denpun Kagaku*, 36:203. (1989).
36. Kawamura et al. *OKUMZ*, *Carbohydrate Res.*, 192:83. (1990).
37. Margaritis A. and P. Baipai. *Biotechnol. Bioeng.*, 34:241, (1982).
38. Fleming, S.E. and J.W.D. Grootwassink, *CRC Food Sci. Nutr.* 12:1, (1989).
39. 농림 수산 통계 연보. 농림부, (1993).
40. 현대 생약학. 생약학 연구회, 학창사. (1994).
41. 동의보감. 삼성 문화사. 대전, (1986).
42. 김일혁, 한규진. *한국생약학회지*. 12:131. (1981).
43. J.S. Hong, J.H.Lee, S.T. Park and H.Y. Lee. *Cytotechnology*, 26:123, (1998).
44. 이기열, 이양자. 1979. 동맥경화증과 관련된 대사 장애 및 치료식이. *한국 영양학회지*. 12(3): 9.
45. Varro, E. Tyler, Lynn R. Brady, James E. Robbers. 1981. "Pharmacognosy". 8th: 103.
46. Ernest Guenther. 1948. "Essential Oils". 3: p87.
47. *ibid.* 1948. 1: p371.
48. 성낙도, 김미란, 하지홍, 권병목, 정하원, 안병태, 유시용. 2000. 자생 식물로부터 Cyclin-dependent Kinase 4/Cyclin D1 저해물질의 탐색. *한국농화학회지*. 43(3):174-178.
49. Kim, J. H. 1994. *Pear culture*. Osung Publ. p11.
50. Yu, T. J. 1989. *Sikpunbogam*. Munudang. p166.
51. 이근광, 김영길, 이민웅, 이형환. 1999. 양식 가물치(*Channa argus*)에 대한 *Saprolegnia* sp.의 병리학적 특성과 물곰팡이의 생장을 제어하는 정유의 영향. *The Kor. J. of Mycology*. 27(1): 32-38.
52. 김순일, 안용준, 이상길, 김준범, 변병호. 1996. 국내산 및 일본산 식물체 추출물의 솔잎혹파리 유충에 대한 살충활성. *Kor. J. Appl. Entomol.* 35(2): 153-158.
53. 지형준. 1962. *Angelica gigas* Nakai 성분의 약리학적 연구. *충북대학논문집*. 11: 573-582.
54. Ahn, K. S., Sim. W. S. and Kim. I. H. 1995. Detection of anticancer activity from the root of *Angelica gigas in vitro*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 5:105-109.
55. Ahn, K. S., Sim. W. S. and Kim. I. H. 1995. Decursin: A cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta Med.* 62: 7-9.
56. 山原條二等. 1983. *生業*. 37: p17.

57. Yamahara, J. 1990. *J. Ethnopharmacol.* **29**: p341.
58. 이덕봉. 1981. 한국 동식물도감 식물편(유용식물). 삼화출판사. 15권. p264, 419.
59. 이상인. 1981. 본초학. 진서원. p129.
60. 식생활 개선 범국민 운동본부. 1985. 월간 식생활. 2월호. p.88.
61. 생약연구회. 1994. 현대 생약학. 학창사. 서울. p338-340.
62. 金島弘恭, 山口智弘, 木下良裕. 1975. 川芎の藥理學的研究(第1報). 川芎エーテルエキスの鎮靜作用. 北海道立衛生研究所報. **25**: 12-14.
63. 酒井和太郎. 1916. 芎藭の藥理學的竝に二化學的研究. 東京醫學雜誌. **30**: 935-972.
64. 許凌. 1966. 東醫寶鑑. 서울. 南山堂. p303.
65. 육창수. 1990. 원색한국약용식물도감. 서울. 아카데미서적. p539.
66. 정보섭, 신민교. 1990. 도해향약(생약) 대사전 식물편. 영림사. p551.
67. 이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사. p761.
68. Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of Cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of Cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**(6): 1192.
69. T. Kada, k. Tutikawa & Y. Sadaie. 1972. *Mutation Res.* **16**: 165.
70. Yukiaki, K. 1996. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cell. *Mut. Res.* **361**: 179-186.
71. Michael, C. A., A. S. Domnic and M. Ahne. 1988. Feasibility of drug Screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**: 589-601.
72. Masakico, S. and M. Masubi. 1995. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by Jararhagin. *Toxicon.* **33**(12): 1605-1617.
73. Seico, Y., S. Kazumaxa and F. Gunki. 1996. Isolation from α -Zein of Thermolysin peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**(40): 661-663.
74. Wellling D., J. Tina, B. Mikael, S. Troels, and R. S. Michael. 1996. Evaluation of Isofagomine and Its Derivatives as Potent Glycosidase inhibitors. *Biochemistry.* **35**: 2788-2795.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.